UNIVERSITY OF TORONTO
3 1761 01294261 1

Dr. G. Stehli u. Dr. E. Kolumbe

Die Botanische Mikrotechnik

Handbuch der mikroskopischen Technik Band 12

Franckh'sche Verlagshandlung, Stuttgart

Handbuch der mikroskopischen Technik

XII. Teil

Die Botanische Mikrotechnik

Handbuch der mikroskopischen Technik

unter Mitwirkung von:

Kreisarzt Dr. E. Beintker, Düsseldorf (Bakteriologische Technik, 2. Teil) — Dr. J. Donau, Graz (Mikrochemische Technik) — Dr. J. Georgi, Hamburg-Grossborstel (Mikroprojektion) — Hanns Günther, Zürich (Das Mikroskop und seine Nebenapparate) — Oskar Heimstädt, Wien (Ultramikroskop und Dunkelfeldbeleuchtung) — Prof. Dr. Kaiserling, Königsberg (Mikrophotographie) — Dr. Fritz Köhler, Berlin (Mikrokinematographie) — C. Leiss, Berlin-Steglitz und Prof. Dr. H. Schneiderhöhn, Freiburg i. Br. (Mikroskopische Untersuchung kristallisierter Körper) — Dr.-Ing. F. Rapatz und A. Meyer, Düsseldorf (Metallmikroskopie) — Dr. A. Reitz, Stuttgart (Bakteriologische Technik, 1. Teil) — Dr. G. Stehli, Stuttgart (Mikrotomie) — Dr. G. Stehli, Stuttgart und Dr. E. Kolumbe, Kiel (Botanische Mikrotechnik) — Dr. G. Steiner, Washington (Technik der Hydrobiologie u. Planktonkunde)

herausgegeben von der Redaktion des Mikrokosmos

XII. Teil:

Die Botanische Mikrotechnik

von

Dr. G. Stehli und Dr. E. Kolumbe

1929
Geschäftsstelle des Mikrokosmos:
Franckh'sche Verlagshandlung, Stuttgart

Die Botanische Mikrotechnik

Ein Leitfaden
der botanisch-mikroskopischen Arbeitsmethoden, zugleich eine Einführung in die Pflanzenanatomie

Von Dr. G. Stehli
und Dr. E. Kolumbe

Mit 95 Abbildungen

UNIVERSITY OF TORONTO LIBRARY

1929
Geschäftsstelle des Mikrokosmos:
Franckh'sche Verlagshandlung, Stuttgart

799.

Nachdruck verboten

Alle Rechte, insbesondere das der Übersetzung vorbehalten

Copyright 1929
by Franckh'sche Verlagshandlung, Stuttgart

Printed in Germany

Chr. Belser A.G., Buchdruckerei, Stuttgart

Einleitung

Die vorliegende Arbeit soll nur eine kurze Einführung in die botanische Mikrotechnik und in die Pflanzenanatomie sein. Daraus ergaben sich für die Bearbeiter verschiedene Gesichtspunkte, deren Erörterung hier notwendig wird.

Im ersten Teil erfolgt die Einführung in die Untersuchungsmethoden. Die außerordentlich weit verstreute und zum Teil auch hochspezialisierte Literatur macht es dem Anfänger schwer, sich durch das Gewirr der beschriebenen Methoden hindurchzufinden. Deshalb haben sich die Verfasser auf eine ganz enge Auswahl bewährter Methoden beschränkt, die seit vielen Jahren in der Botanik erprobt sind und die jeder, der sich mit Botanik befaßt, in einem Praktikum erlernen muß. Erst nach Beherrschung dieser Handgriffe wende man sich neuen Verfahren zu. Um den zur Verfügung stehenden Raum nicht zu überschreiten, mußten wir das Arbeiten mit dem Mikroskop und Bau und Handhabung des Mikroskops und des Mikrotoms als bekannt voraussetzen, zumal wohl alle Leser des Mikrokosmos im Besitze der entsprechenden Buchbeilagen von Günther (1 und 2)[1]) und Stehli (3) sind.

Die Beschaffung des Untersuchungsmaterials könnte für manche Bearbeiter, besonders solche, die in der Großstadt wohnen, recht schwierig sein. Mit Rücksicht auf diesen Umstand wurde daher eine besondere Auswahl der Pflanzen getroffen. Alle behandelten Arten finden sich als Vertreter in unserer heimischen Flora oder gehören zu den in Parken und Anlagen eingebürgerten Arten. Manches Untersuchungsobjekt wird man auch durch die Kultur gewinnen können. Einfache Kulturmethoden finden sich im zweiten Teil bei den betreffenden Objekten immer mitbeschrieben und für Schulen empfiehlt es sich außerdem, schon bei Anlage des Schulgartens Rücksicht auf die in der Mikroskopie gebräuchlichen Arten zu nehmen (s. Brohmer-Stehli, 10).

Vielen Bearbeitern wird es auch an der nötigen Pflanzenkenntnis mangeln. Das Kennenlernen ist nicht so schwierig und beim Heranziehen guten Abbildungsmaterials wird man immer schon durch den Vergleich zu einem annähernden Resultat kommen, das dann durch die Benutzung einer guten Bestimmungsflora noch genauer werden kann. Besonders sei hier auf das im gleichen Verlag erschienene Büchlein von Graebner, „Taschenbuch zum Pflanzenbestimmen" hingewiesen. Daneben benutze man dann das Büchlein von Albert Christiansen, „Taschenbuch einheimischer Pflanzen" (Verlag J. Schreiber, Eßlingen), das die einzelnen Arten nach ihrer Blütezeit zusammenstellt. Wichtig und unentbehrlich für die genaue Bestimmung sind die leicht zu handhabenden Bestimmungsfloren von Fitschen, „Flora von Deutschland" und „Gehölzflora" (Verlag Quelle u. Meyer, Leipzig). Mit dieser Literatur ausgerüstet, wird man immer die zu bearbeitenden Objekte mit einem hohen Grade von Sicherheit auffinden können. Durch anfängliche Mißerfolge soll sich der Bearbeiter nur nicht entmutigen lassen; Übung und Einfühlung sind auch hier erforderlich. Über die richtige Zeit der Beschaffung des behandelten Pflanzenmaterials gibt das Bändchen von Günther-Stehli, „Tabellen zum Gebrauch bei botanisch-mikroskopischen Arbeiten, I: Phanerogamen" eine zuverlässige und erschöpfende Zusammenstellung.

Die im zweiten Teil des Buches dargestellten anatomischen und entwicklungsgeschichtlichen Einzelheiten erstreben keine Vollständigkeit. Sehr häufig mußte auf manche wichtige Tatsache verzichtet werden und die Benutzung eines ausführlichen Lehrbuchs der Botanik ist unbedingt notwendig. Nur einzelne Punkte konnten geklärt werden, die Verbindungslinie muß der Bearbeiter immer erst durch das Selbststudium herstellen.

Wichtig für die Erzielung guter Resultate ist die genaue Befolgung der angegebenen Methoden, denn mancher Mißerfolg, der vom Bearbeiter gerne der Methode zugeschrieben wird, ist auf ungenaues Arbeiten zurückzuführen. Die Selbsterziehung zur peinlichsten Genauigkeit ist fast gleichbedeutend mit Erfolg bei der Arbeit.

[1]) Die Zahlen beziehen sich auf das Literaturverzeichnis am Schluß des Buches.

I. Die Bearbeitung des Materials

A. Freihandtechnik

1. Allgemeines über die Anfertigung der Präparate

Zur Anfertigung von Präparaten werden Objektträger und Deckgläser benötigt. Die Objektträger müssen vor dem Gebrauch gründlichst gereinigt werden, indem man sie in verdünnter Schwefel- oder Salpetersäure wäscht und dann in Wasser abkocht. Nach dieser Behandlung werden sie mit einem feinen, keine Fasern abgebenden Tuch sauber geputzt und staubsicher aufbewahrt. Mit den Deckgläsern kann man

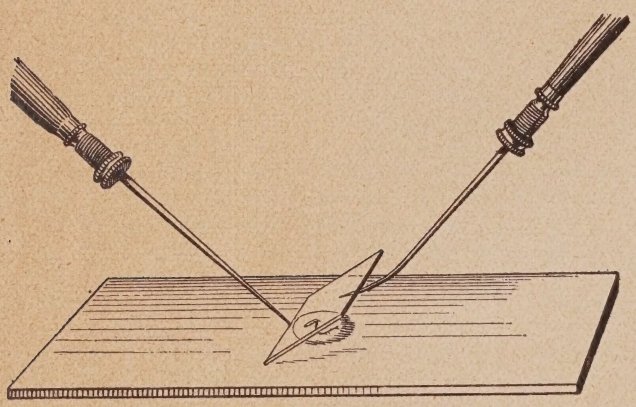


Abb. 1. Wie man ein Deckglas auflegt

in gleicher Weise verfahren, doch bewahre man sie nicht trocken, sondern in Alkohol auf — wozu man den bei den Arbeiten gebrauchten verwenden kann — und entnehme sie erst kurz vor dem Gebrauch dem Alkohol.

Bei der Anfertigung eines Präparates, das z. B. in Wassereinschluß untersucht werden soll, geht man folgendermaßen vor: Der Objektträger ist gründlich gereinigt und zur Aufnahme des Objekts fertig gemacht. Man überträgt nun einen Wassertropfen auf den Objektträger und gibt das Objekt mit Hilfe eines Pinsels, eines Spatels oder einer Präpariernadel hinzu. Erst dann reinigt man das Deckglas mit einem Fensterleder vom Alkohol, indem man es zwischen Daumen und Zeigefinger der linken Hand hält und mit dem Fensterleder, ohne Druck auszuüben, vorsichtig nach einer Richtung wischt, dann diese Kante zwischen die Finger nimmt und genau so nach der anderen Richtung führt, bis das Deckglas völlig trocken und völlig rein erscheint. Nun legt man es so auf, daß eine Kante des Deckglases zuerst den Objektträger berührt. Diese Seite stützt man mit einer Nadel und läßt das Deckglas langsam sinken, bis es auf dem Wasser schwimmt (s. Abb. 1). Das Deckglas muß in dieser Weise aufgelegt werden, weil beim Auflegen parallel zum Objektträger sich zu viel Luftbläschen mit einschleichen würden. Ist zuviel Wasser vorhanden, so dringt dieses unter den Kanten des Deckglases hervor und kann hier mit Fließpapier abgesogen werden.

Man muß unterscheiden zwischen Augenblickspräparaten, Zeitpräparaten und Dauerpräparaten. Die Dauerpräparate werden hier nur kurz gestreift; eine eingehende Darstellung findet sich in Teil B, der die Mikrotomtechnik behandelt.

Das Wort Augenblickspräparat sagt schon, daß es sich nur um Präparate handelt, die für die schnelle Beobachtung angefertigt werden. Man kann die Objekte trocken auf dem Objektträger untersuchen (Pollenkörner, Sporen usw.) oder in Wasser, Alkohol, Kalilauge usw. einschließen. Trockenpräparate können nur von kleinen und durchsichtigen Objekten hergestellt werden und bedürfen keines Deckglases. Überträgt man aber die Objekte in eine Flüssigkeit, dann muß das Deckgläschen benutzt werden, da sonst durch die Reagentien die Linsen des Mikroskops beschädigt werden können. Nach der Beobachtung werden Objektträger und Deckglas wieder gereinigt und sind fertig zur Aufnahme eines neuen Objekts.

Will man Schnitte längere Zeit beobachten oder das Auskeimen von Pollenkörnern sehen, so darf die Untersuchungsflüssigkeit nicht austrocknen. Die Objekte müssen eine bestimmte Zeit gehalten werden können: Zeitpräparate. Der ganze Objektträger mit dem vom Deckglas bedeckten Objekt wird in eine feuchte Kammer gebracht und kann für mehrere Tage stets zur Beobachtung bereit sein. Eine feuchte Kammer stellt man sich leicht aus einem flachen Teller und aus einer Glasglocke her. Der Teller wird mit einer dicken Lage feuch-

ten Fließpapiers ausgelegt, ein Klötzchen zur Aufnahme des Präparats daraufgestellt und die Glocke darüber gestülpt. Bald bildet sich durch Verdunstung des Wassers eine von Wasserdampf gesättigte Luft und der Objektträger kann jetzt ohne Gefahr, daß eine Austrocknung erfolgen könnte, in die feuchte Kammer übertragen werden.

Will man gutgelungene Schnitte aufbewahren und keine umständliche Präparation anwenden, dann bedient man sich der Glyzeringelatine, die einen guten und schnellen Verschluß abgibt. Das Objekt wird aus dem Wasser in Glyzerinalkohol (Alkohol und Glyzerin zu gleichen Teilen) überführt. Inzwischen bringt man wenig Glyzeringelatine auf einen sauberen Objektträger und erwärmt bis zum Flüssigwerden über einer Spiritusflamme. Das Objekt wird nun in die flüssige Glyzeringelatine übertragen und zur Vermeidung von Bläschenbildung nochmals kurz erwärmt, dann das Deckglas darüber gedeckt. Die Erfahrung muß zeigen, wieviel Glyzeringelatine man nehmen darf; quillt sehr viel unter dem Deckglas hervor, dann bettet man zweckmäßig um. Ohne besonderen Randverschluß haben diese Präparate eine nicht sehr lange Lebensdauer, weil bei ungenügend sicherer Aufbewahrung Verstaubung und Milbenfraß auftreten können. — Für Dauerpräparate in Harzeinschluß vgl. S. 38.

2. Beobachtungspräparate von kleinen Objekten

Das Beobachten von kleinen Objekten hat recht häufig seine Schwierigkeiten, trotzdem keine besonderen Präparationsarbeiten damit verbunden sind. Moosblättchen, Moosvorkeime, Fadenalgen, Wurzelhaare, Sporen, Pollenkörner, Spermien und andere Objekte kann man ohne weiteres in Wassereinschluß untersuchen, doch ergeben sich manchmal Bilder, die eine Deutung für den Anfänger nicht zulassen.

Zur Beobachtung wähle man z. B. Wurzelhaare von *Hydrocharis* (Froschbiß), um den Zellbau zu studieren. Auf einen gereinigten Objektträger wird ein Tröpfchen Wasser aufgebracht und nachdem das Objekt von der Wurzel mit einem Schnitt abgetrennt ist, darin übertragen. Man bedeckt jetzt mit einem Deckgläschen und kann unter dem Mikroskop beobachten. Etwa vorhandene Luftblasen, die sich als schwarz umrandete Kreise im Präparat zeigen, entferne man durch gelindes Erwärmen oder durch einen leichten Druck auf das Deckgläschen.

Sind die Objekte sehr fein und muß man befürchten, daß ein Zerquetschen durch das Auflegen des Deckglases eintritt, dann muß das Deckglas mit Wachsfüßchen versehen werden. Eine Mischung von drei Teilen erhitzten Bienenwachses und einem Teil Terpentin ergibt ein plastisches Wachs. Durch Drehen mit den Fingerspitzen fertigt man ein kleines, dünnes Röllchen an und sticht mit den Deckglasecken gleich große Stücke ab. (Derartiges Wachs ist in abgepaßter Form direkt gebrauchsfertig erhältlich.) (S. Abb. 2.) Dann legt man das Deckglas mit den Wachsfüßchen nach unten auf den Objektträger und drückt leicht an, bis die Verbindung mit der Untersuchungsflüssigkeit hergestellt ist.

Bewegliche Objekte (Planktonalgen usw.)

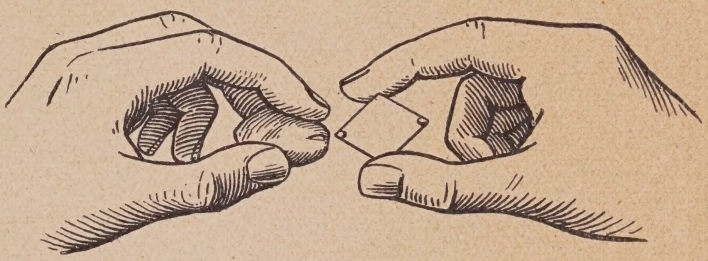


Abb. 2. Entnahme der Wachsfüßchen vom Wachsblock

können durch langsames Andrücken des Deckglases festgelegt werden, doch ist hierbei große Vorsicht geboten; ein Zerquetschen kann leicht eintreten. Um Bewegungsbeobachtungen anzustellen, setzt man Tuschelösungen der Untersuchungsflüssigkeit zu. Von der Seite wird dem Deckglas ein Tropfen mit stark verdünnter Pelikantusche mit dem Pinsel zugeführt; gleichzeitig saugt man von der anderen Seite mit Fließpapier die Untersuchungsflüssigkeit ab und zieht dadurch die Tusche unters Deckglas. Die Objekte (z. B. Bakterien) erscheinen dann hell in schwarzer Umrandung. — Gelatinelösung ($3^0/_0$ig), Quittenschleim und Verdünnungen von Gummi arabicum können zur Eindikkung des Beobachtungstropfens gut verwendet werden. Die Beweglichkeit der Objekte wird durch diese Medien sehr stark herabgesetzt. — Zur Aufhellung undurchsichtiger Objekte verwende man die auf S. 7 angegebenen Aufhellungs-Flüssigkeiten.

3. Herstellung von Freihandschnitten von größeren Objekten

Die meisten Untersuchungen pflanzlicher Objekte verlangen eine Zerlegung, die auf

verschiedene Weise vorgenommen werden kann. Bevor auf die Mikrotomtechnik eingegangen wird, sei ganz kurz auf das Schneiden aus der freien Hand mit Hilfe des Rasiermessers hingewiesen, das fast in allen Fällen — wenigstens für den Anfänger — ausreicht. Soll von einem Objekt nur ein Übersichtsbild gewonnen werden, d. h. soll die Struktur nur in ihren großen Umrissen erkannt werden, dann genügt der Rasiermesserschnitt vollständig. Das Material muß, wenn es in frischem Zustande zu weich sein sollte, 24 Stunden in Alkohol gehärtet werden, dem man etwas Glyzerin zugefügt hat.

So lassen sich bei einiger Übung sehr bequem Quer- und Längsschnitte durch Stengel, Blätter und Hölzer herstellen. Harte Objekte (z. B. Hölzer) müssen vor dem Schneiden in Glyzerin geschmeidig gemacht werden. Ganze Querschnitte durch diese Objekte zu erlangen, dürfte sehr schwierig sein, doch genügen schon kleine Schnitte aus bestimmten Teilen. Zur Vorbehandlung der Hölzer mit chemischen Reagentien vgl. S. 7 (Entkieselung).

Im Botanischen Praktikum von Strasburger-Koernicke (1923, S. 117 u. 118) sind die wichtigsten Regeln für das Schneiden mit dem Rasiermesser zusammengestellt. „1. Die Schnittfläche ist vor dem Schneiden zu befeuchten und zwar für gewöhnlich mit Wasser. (War das Objekt mit Glyzerin vorbehandelt, dann Anfeuchten mit Glyzerin.) 2. Der oberste Schnitt ist nicht zu gebrauchen, da hier das Gewebe durch das Taschenmesser zu stark beschädigt wurde. 3. Man darf aus resistentem Gewebe . . . nur

Abb. 3. Wie man das Rasiermesser beim Schneiden halten soll

sehr kleine und äußerst dünne Schnitte herstellen, da die Schneide sonst leicht schartig wird. Ist man mit der Schneide zu tief in das Gewebe geraten und merkt, daß der Widerstand wächst, so ziehe man das Rasiermesser zurück, anstatt den Schnitt zu Ende führen zu wollen. 4. Man beginne, falls es die Untersuchung nicht etwa anders fordert, den Schnitt nicht mit dem Rande des Objektes, lege vielmehr die Schneide der Schnittfläche auf; man gewinnt so einen viel sichereren Halt, um einen dünnen Schnitt auszuführen. 5. Um einen wirklich guten, d. h. einen solchen Schnitt zu erhalten, in

Abb. 4a. Einklemmen eines Blattstückchens in Holundermark, zur Anfertigung von Querschnitten

4b. Einklemmen eines Stengelstücks in Holundermark zur Anfertigung von Längsschnitten

welchem die einzelnen Gewebselemente durch das Messer nicht zerrissen werden, muß die Schneide nicht einfach gegen die Schnittkante gedrückt, vielmehr an dieser zugleich hingezogen werden. Daher gewöhne man sich, womöglich frei zu schneiden (Abb. 3), und vermeide es, die schneidende Hand mit dem Daumen auf die andere Hand zu stützen. Beim Schneiden lege man die untere Fläche der Messerklinge auf den Zeigefinger der den Gegenstand haltenden Hand. 6. Kleine Objekte spanne man in Holundermark ein und schneide diese zusammen mit dem Mark. 7. Man begnüge sich nicht mit einem einzigen Schnitt, führe vielmehr stets eine größere Anzahl aus, um die besten für die Untersuchung auswählen zu können."

Um aus freier Hand gleichmäßige und größere Schnitte zu erhalten, kann man sich zweier besonderer Methoden bedienen. Aus jungen Zweigen des Holunders holt man sich durch Abspalten des Holzes das Mark heraus und läßt dieses trocknen. Das runde Holundermark wird mitten durchgespalten und in den Spalt klemmt man das zu schneidende Stück mit Daumen und Zeigefinger der linken Hand fest (Abb. 4) und führt gleichmäßig Schnitte mit der rechten Hand aus. Das Mark wird mitgeschnitten und das Messer erhält dadurch eine etwas sicherere Führung, als wenn gleich am Objekt angesetzt würde.

Sehr gut zu gebrauchen sind auch die Zylindermikrotome. Im Hohlzylinder wird das Objekt einfach oder mit Hilfe von Holundermark eingeklemmt und die obere breite Führungsfläche erlaubt einen sicheren Schnitt, der in der Stärke durch einen unten angebrachten Drehring reguliert werden kann; das Objekt wird durch die Drehung um die entsprechende Schnittstärke hochtransportiert.

4. Zupfpräparate und Dünnschliffe

Häufig kommt es vor, daß man kleine Objekte, bevor man an die eigentliche Beobachtung gehen kann, präparieren muß. Eine kleine Blüte z. B. muß zergliedert werden oder der Vegetationskegel einer *Elodea* (Wasserpest) muß von der Blatthülle befreit werden. Durch vorsichtiges und planmäßiges Zerzupfen des Objekts kann man die zu beobachtenden Teile von ihren Hüllen freilegen.

Zu dem Zweck bedient man sich bei grösseren Objekten einer Präparierplatte (Abb. 5), die hälftig schwarz und weiß gestrichen und dann glasiert ist; je nach dem Objekt kann die Unterlage gewechselt werden. Das Material wird, wenn es frisch ist, nicht im Wasser schwimmend untersucht und präpariert, sondern nur mit Wasser angefeuchtet. Alkoholmaterial muß in Alkohol oder Benzolalkohol verarbeitet werden; häufig läßt aber die Härtung, die die Objekte durch das Aufbewahren in Alkohol erfahren haben, gar keine Präparation mehr zu. Zum Zerlegen gebraucht man Präpariernadeln, die für billiges Geld zu haben sind; man kann sich aber auch mit Häkelnadeln behelfen, denen die Haken abgeschliffen worden sind. Die eine Nadel hält das Objekt fest und die andere Nadel führt die nötigen Manipulationen zur Entfernung der überflüssigen Teile aus. Wenn möglich muß ganz vorsichtig präpariert werden; ein Reißen mit der Nadel kann das ganze Objekt verderben und der Anfänger wird manches Objekt durch unvorsichtiges Arbeiten zerstören; durch Übung erreicht man aber bald eine gewisse Geschicklichkeit. Sind einzelne Teile des Objekts sehr zähe und widerstandsfähig, dann greife man zur Schere, die in besonderer Konstruktion für diese Zwecke vorhanden ist oder zum Skalpell.

Sehr kleine Objekte müssen mit Hilfe von Präparierlupen bearbeitet werden. Da der Objekttisch eine gewisse Höhe hat, ist zur sicheren Arbeit eine Unterstützung der Hände erforderlich. Handstützen oder das Aufschichten von Büchern zu beiden Seiten der Präparierlupe werden den Händen den nötigen Halt geben können. Natürlich kann man auch zu diesem Zweck sich eines Präpariermikroskops bedienen, das in verschiedenen Ausführungen erhältlich ist.

Auf die Größe des zerzupften Objekts kommt es an, wie man weiter verfahren muß. Ist das Objekt groß genug, daß man es ohne Gefahr einer Beschädigung mit der Pinzette erfassen kann, dann wird man es aus der Masse des abpräparierten Materials herausgreifen und auf einen sauberen Objektträger bringen. Bei sehr kleinen Objekten empfiehlt sich aber der umgekehrte Weg: das überflüssige Material wird mit der Nadel fortgeräumt und das Objekt bleibt auf dem Objektträger und kann hier gleich weiter verarbeitet werden.

Die Herstellung eines Dünnschliffs ist bedeutend schwieriger, und der Anfänger wird gerade hier bei nicht sehr großer Ausdauer manchen Mißerfolg erleben. Samenschalen, fossile Pflanzen und bestimmte, in Gestein versenkte Flechten sind nicht schneidbar und müssen zur Untersuchung geschliffen werden. Bei Steinflechten und fossilen Pflanzen ist es meistens so, daß man ein Stück zur Bearbeitung mit dem Hammer absprengen muß, während die Samenschalen noch die Anwendung der Laubsäge gestatten.

Der zweite Fall ist sehr viel angenehmer als der erste, weil man hier nämlich gleich die Schliffebene durch das Sägen in bequemer

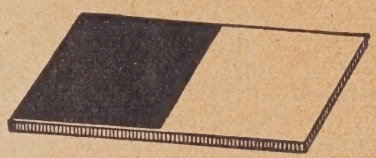


Abb. 5. Schwarz-weiße Präparierplatte

Weise festlegen kann. Hat man z. B. aus einer harten Samenschale eine passende Lamelle herausgesägt, dann kann man folgendermaßen verfahren: Man stellt sich auf einer Glasplatte, die mit einem gröberen Schmirgelpulver bestreut und mit Wasser angefeuchtet ist, eine erste Schliffebene her und glättet diese durch weiteres Schleifen mit feinem Schmirgelpulver. Der Zeigefinger drückt das Objekt gegen die Glasplatte und führt kreisend die Schleifbewegung aus. Beim Schleifen dürfen sich keine kratzenden Geräusche bemerkbar machen; es ist dies immer ein Zeichen dafür, daß kleine Stückchen vom Objekt abgesprengt und zwischen Glasplatte und Schliffläche geraten sind. Durch Abspülen werden diese Teilchen entfernt. Hat der Schliff die gewünschte Fläche erreicht, dann schleift man mit feinstem Polierschmirgel nach und spült mit Wasser ab. Die Kontrolle unter dem Mikroskop bei auffallendem Licht wird zeigen, ob die Fläche den Ansprüchen eines sauberen Schliffes entspricht.

Bevor man an das Schleifen der zweiten Seite herangeht, muß das Objekt erst austrocknen. Die Schliffläche wird nach dem Austrocknen mit erwärmtem Kanadabalsam auf einen Objektträger fest aufgeklebt (keine Luftblasen zwischen Objekt und Objektträger!), und es muß bis zur Erstarrung des Balsams gewartet werden. Beim starken Anpressen des Objekts gegen den Objektträger wird der Kanadabalsam an den Seiten hervorquellen und durch Auflegen und An-

pressen von Deckglassplittern rund um das Objekt herum kann man gleich Vorsorge tragen für das weitere Schleifen (Stützung des Objekts!) und für die Erreichung einer bestimmten Schliffstärke (nach Strasburger-Koernicke). Das Schleifen geht nun wieder so vor sich, wie es vorher beschrieben worden ist, nur muß man sehr darauf achten, daß der Objektträger immer parallel zur Schleifplatte gehalten wird. Hat das Objekt seine bestimmte Stärke erreicht, dann ist durch häufiges Abspülen und Nachschauen festzustellen, ob sich auch Rißerscheinungen bemerkbar machen. Nach Beendigung des Schleifens wird die zweite Schliffläche gut gereinigt und poliert und das Objekt kann jetzt eingebettet werden.

Zur Einbettung können zwei Wege eingeschlagen werden (nach Schneider, 1922): Die Umgebung des Objekts wird von Kanadabalsam und den aufgeklebten Deckglassplittern durch Xylol mit einem feinen Läppchen gereinigt. Man läßt nun einen Tropfen Xylolbalsam auf das Objekt fallen und bedeckt mit einem Deckglas. Sollen aber die Poren und Gänge im Schliff nachgewiesen werden, so muß das Objekt vom Objektträger entfernt werden. Der Objektträger wird in Xylol eingestellt und nachdem der Kanadabalsam sich gelöst hat, fängt man das Objekt ganz vorsichtig mit einem Pinsel ab und überträgt es in reines Xylol, aus diesem in 96%igen Alkohol und in Wasser. Der Schliff muß nun lufttrocken werden. Ist dies erreicht, so bringt man den Schliff auf einen Objektträger, fügt einen Tropfen Kanadabalsam hinzu und bedeckt mit einem Deckglas. Bevor der Balsam in die Poren eindringen kann, erstarrt er schon und unter dem Mikroskop treten jetzt die Poren und Gänge gut hervor.

Gegen das Schleifen mit Schmirgel wird der Einwand erhoben, daß das feine Schmirgelpulver in die Objekte eindringt, nicht wieder entfernt werden kann und falsche Bilder sich ergeben. Schönere und schnellere Resultate erzielt man durch das Schleifen mit Feilen mit feiner Abstufung der Furchenbreite und Nachbehandlung auf Arcansassandstein.

Die erste Methode wurde hier aber so eingehend geschildert, weil sie leicht ausgeführt werden kann, befriedigende Resultate liefert und kein Instrumentarium wie die zweite Methode erfordert.

5. Das Mazerieren

Zur Untersuchung der Einzelzellen müssen die Gewebe zerstört werden, so daß die Mittellamelle der Zelle sich auflöst und die Zellhaut, Gestalt und Größe der Einzelzelle bequem beobachtet werden kann. Man bedient sich meistens dazu bestimmter Säuren oder Basen, kann aber auch auf mechanischem Wege durch Zerzupfen mit Stahl- oder Glasnadeln zum Ziele gelangen. Nach dem Material wird es sich richten, welche Art der Bearbeitung man wählen muß. Der Zellinhalt wird durch die Operationen meistens stark angegriffen.

Für holzige Pflanzenteile wird das Schulzesche Mazerationsgemisch (HNO_3 und $KClO_3$) am häufigsten angewandt. Kleine Spuren des zu untersuchenden Holzes werden in einem Reagenzglas mit 2 ccm konzentrierter Salpetersäure übergossen und nachdem einige Kristalle Kaliumchlorat zugesetzt worden sind, erwärmt man langsam bis zur Blasenentwicklung. — Bei der Erwärmung entwickeln sich sehr schädliche Gase und man nimmt diese Arbeit am besten unter dem Abzug oder am offenen Fenster vor. Die Flüssigkeit wird nach dem Erwärmen vorsichtig abgegossen und mehrfach durch reines Wasser oder Alkohol ersetzt. Kleine Stückchen des stark erweichten Objekts werden nun auf den Objektträger übertragen und mit der Nadel zerzupft; sehr häufig genügt schon ein leichter Druck mit dem Deckglas, um die Trennung der Zelle herbeizuführen.

Das Schulzesche Gemisch ist in der Handhabung etwas umständlich und kann, wenn es auf große Genauigkeit bei der Untersuchung nicht ankommt, durch Chromsäurebehandlung ersetzt werden. Chromsäure läßt man auf fertige Schnitte einwirken. Die Schnitte werden in eine gesättigte wässerige Lösung der Säure gebracht und nach der Einwirkungsdauer von 1—5 Minuten mit viel Wasser ausgewaschen; die Zellen lassen sich dann durch Zerzupfen leicht aus dem Verband lösen. Vor dem Schulzeschen Gemisch hat Chromsäure den Nachteil, daß sie die Zellhaut bei längerer Einwirkung stark angreift.

Für krautige Pflanzenteile und Früchte werden verschiedene Behandlungsarten angegeben. Durch kochendes Wasser kommt man bei Früchten schon zum Ziele; auch verdünnte Oxal- oder Essigsäure wirkt bei Kartoffeln und Mohrrüben sehr energisch. Krautige Pflanzenteile behandelt man 24 Stunden mit 1 Teil Salzsäure und 5—3 Teilen Alkohol und überträgt sie nach dem Auswaschen in 10%iges Ammoniak. Das Kochen in 50%iger Kalilauge bewirkt eine schnelle Mazeration; die Untersuchung und das Zerzupfen erfolgen im Wasser.

Im zweiten Teil des Buches wird bei der einzelnen Arbeitsaufgabe auf diese Methoden und ihre Anwendung noch näher hingewiesen.

6. Das Entkalken und Entkieseln

Die Einlagerung von kohlensaurem Kalk und die Verkieselung mancher Pflanzenteile machen eine Vorbehandlung unbedingt notwendig; schnittfähige Objekte sind nämlich nicht zu erhalten, wenn die Substanzen noch eingelagert sind.

Bei Vorhandensein von kohlensaurem Kalk (z. B. bei Armleuchtergewächsen) (Characeen) wird man schon bei der Wahl des Fixiergemisches darauf Rücksicht nehmen und säurehaltige Gemische bevorzugen. Chromsäure, Chromessigsäure, Sublimat-Eisessig, Pikrinsäure, Flemmingsches Gemisch, Pfeiffersches Gemisch usw. wirken durch ihren Säuregehalt schon langsam entkalkend bei gleichzeitiger Fixierung. Die Gemische müssen, damit ein möglichst vollständiger Kalkentzug vor sich geht, häufiger gewechselt werden. Die Lösung des Kalkes darf aber nur so vor sich gehen, daß keine stürmische Kohlensäurebildung erfolgt, da sonst Zerreißungen innerhalb der Gewebe eintreten können. — Neben den oben genannten Fixiergemischen wird folgendes Gemisch empfohlen, das gleichzeitig fixiert und entkalkt: 3 ccm Salzsäure, 5 ccm 1%ige Chromsäure, 5 ccm 1%ige Osmiumsäure und 5 ccm absoluter Alkohol; das Gemisch muß 48 Stunden einwirken. — Oxalsaurer Kalk wird entfernt durch Lösungen, die Salz- oder Salpetersäure enthalten.

Soll bereits fixiertes Material noch nachträglich entkalkt werden, so gibt man zu 70%igem Alkohol 3—5%ige Salpetersäure oder Salzsäure hinzu und überführt die Objekte. Milchsäure (10%ige) und schweflige Säure wirken sehr rasch entkalkend.

Starke Verkieselungen und Einlagerungen von mineralischen Bestandteilen bei Hölzern, Gramineen, Schachtelhalmen usw. müssen durch Flußsäure (Fluor-Wasserstoffsäure) beseitigt werden. Flußsäure greift selbst Gläser an und die zur Aufnahme der Objekte dienende weithalsige Glasflasche muß mit Paraffin ausgegossen sein. Man schwenkt heißes Paraffin so in der Flasche, daß die ganzen Wände bedeckt werden und in der Mitte ein Hohlraum bleibt. Die Objekte (Fixierung vorher!) werden in Alkohol in die Flasche gebracht und tropfenweise wird Flußsäure zugesetzt. Die Einwirkung soll bei feineren Objekten 24 Stunden nicht überschreiten. — Hölzer werden bis zu 4 Tagen mit 10—15%iger Lösung der Säure behandelt.

Das Arbeiten mit Flußsäure ist nicht ungefährlich, da die Schleimhäute stark gereizt werden, und bei kleineren Objekten wird es sich empfehlen, mit einem Gemisch von Fluornatrium mit Zusatz von Salzsäure zu arbeiten, das weniger unangenehm als Flußsäure ist.

7. Das Bleichen und Aufhellen

Manche Pflanzenteile enthalten natürliche Farbstoffe, die sich bei der Untersuchung als störend erweisen und auch bestimmte Fixiermittel wie Chromsäure, Osmiumsäure und Alkohol rufen Farbveränderungen der Objekte hervor, die vor der weiteren Untersuchung beseitigt werden müssen.

Diese Stoffe können einmal durch Bleichen mit bestimmten Mitteln entfernt werden, andererseits kann aber auch die Wahl eines Einschlußmittels mit entsprechendem Brechungsexponenten eine Aufhellung bewirken. Das gebräuchlichste Aufhellungsmittel ist Wasserstoffsuperoxyd, das in 3%iger Lösung zur Anwendung kommt. Die bereits auf dem Objektträger aufgeklebten Schnitte stellt man in die Lösung ein und kann so die durch Osmiumsäurefixierung hervorgerufene Schwärzung entfernen. Zu langes Einwirken ist zu vermeiden, weil Wasserstoffsuperoxyd leicht mazerierend wirkt.

Auch das Schulzesche Gemisch (vgl. S. 6) wird als Bleichmittel angegeben, doch dürfte seine Anwendung sehr beschränkt sein wegen der stark mazerierenden Eigenschaften.

Freies Chlor wirkt schneller oder langsamer bleichend und man kann es sowohl auf ganze Objekte als auch auf aufgeklebte Schnitte einwirken lassen. Zu einigen Kaliumchloratkristallen fügt man 2—3 Tropfen Salzsäure hinzu und wenn die Chlorentwicklung beginnt, noch einige ccm 50—70%igen Alkohol. Die zu behandelnden Objekte müssen sich in 70—90%igem Alkohol befinden und können ohne weiteres in die Mischung übertragen werden. Einwirkungsdauer 1/4 Stunde bis zu mehreren Tagen.

Die wichtigsten chemischen Aufhellungsmittel sind aber Chloralhydrat, Eau de Javelle, Kalilauge und Karbolsäure.

Chloralhydrat wird in verschiedenen Stärkegraden je nach dem Objekt in Anwendung gebracht (8 Teile Chloralhydrat und 5 Teile Wasser für feinere Objekte — 5 Teile Chloralhydrat und 2 Teile Wasser für stärkere Objekte). Will man z. B. den Gefäßbündelverlauf in Blättern studieren, dann zieht man vorher das Chlorophyll mit Alkohol aus und läßt dann die Lösung einwirken. Die Lösung dringt sehr schnell ein und macht die Objekte vollständig durchsichtig. Auch auf bereits geschnittene Objekte kann man es einwirken lassen.

Eau de Javelle ist eine Lösung von Kaliumhypochlorit und in gebrauchsfertigem Zustand zu haben. Die Aufbewahrung erfolgt unter gutem Verschluß im Dunkeln. — Die Lösung zerstört das Plasma der Zellen sehr

schnell und vollständig, greift Fett und Stärke nur sehr langsam an, löst verholzte Membranen auf und wirkt durch den Gehalt an freiem Chlor sehr stark bleichend. Auf Schnitte soll die Lösung nicht länger als ½ bis 1 Stunde einwirken. Stärkere Objekte, z. B. Blätter, Vegetationskegel und Samen müssen bis zu 12 Stunden in der Lösung verbleiben. Scheidet sich an den Objekten Kalziumkarbonat ab, so ist dieses mit verdünnter Essigsäure zu entfernen.

Kalilauge wird in alkoholischer oder wässeriger Lösung verschiedener Konzentration verwandt. Eine Lösung von 5 g KOH in 100 ccm Wasser oder Alkohol ist am gebräuchlichsten. Man läßt die Lösung auf Schnitte oder ganze Objekte einwirken, wäscht mit Wasser aus und entfernt überschüssige Lauge durch Zusatz von Essig oder Salzsäure. Die Behandlung muß wiederholt werden, wenn die Objekte beim Auswaschen undurchsichtig werden. — Für die Färbung so vorbehandelter Objekte ist Karmin sehr zu empfehlen, da es durch die möglicherweise noch vorhandene Lauge nicht zersetzt wird.

Die physikalischen Aufhellungsmittel wirken durch ihr verschiedenartiges Lichtbrechungsvermögen aufhellend. Bei Besprechung der Einschlußmittel (S. 37) wird darauf eingehender hingewiesen werden.

B. Mikrotomtechnik

8. Das Fixieren der Objekte

a) Die Vorbereitung des Materials

Vom Ziel der Untersuchung hängt es ab, ob man das Objekt im lebenden oder im toten Zustand beobachten und analysieren muß. Die Lebendbeobachtung ist sehr viel einfacher und weniger zeitraubend als die Verarbeitung der abgetöteten Objekte; doch sind der Beobachtung im ersteren Falle recht enge Grenzen gezogen (nur Übersichtsbilder ohne Erkennung der feinsten Struktur) und viele Vorgänge im lebenden Organismus lassen sich nur als Zustände im Präparat feststellen, das aus abgetötetem Material gewonnen wurde. In einer getöteten Pflanzenzelle wird sich immer nur ein Entwicklungsstadium beobachten lassen und erst aus einer ganzen Reihe von Untersuchungen desselben Objekts wird man sich den Ablauf der Entwicklung klar machen können.

Um einen Einblick in den feineren Aufbau der Zellen zu gewinnen, muß also das Objekt abgetötet und in feinste Schnitte zerlegt werden. Der Vorgang des Abtötens wird Fixieren genannt und die dazu verwandten Reagenzien sind die Fixierungsmittel. Diese Mittel sollen nun einen doppelten Zweck erfüllen. Alle Objekte enthalten Wasser, sind mehr oder weniger weich und lassen sich ohne besondere Behandlung nicht gut in feine Schnitte zerlegen. Das Wasser muß durch das Fixierungsmittel entzogen und die Gewebe gehärtet werden. Gleichzeitig erfolgt aber auch das Abtöten des kolloidalen Plasmas, das bei Wasserentzug in seiner Struktur sofort verändert werden würde. Das Plasma wird gewissermaßen niedergeschlagen, ausgefällt in der Zelle, und es soll bei richtig angewandtem Fixiergemisch keine Veränderung gegenüber dem lebenden Zustand zeigen. Formveränderungen, Verlagerungen der Zellkerne, Abhebung des Plasmas von den Wänden und wellige Verbiegung der Zellwände, das sind Erscheinungen, die durch schlechte Fixierung hervorgerufen werden. Die Zelle muß von dem abtötenden Gemisch gewissermaßen überrascht werden, der Tod muß plötzlich sein und ohne jede Veränderungsreaktion in der Zelle eintreten. Je schneller und energischer das Fixiergemisch in die Gewebe eindringt, desto besser wird auch seine Wirkung sein. Ganz klar muß es hier ausgesprochen werden, daß kein Fixiergemisch den geforderten Ansprüchen vollständig genügt; Strukturveränderungen im Plasma werden hervorgerufen, die dem lebenden Plasma fremd sind und sie müssen als Kunstprodukte erkannt und gewertet werden.

Vor der Besprechung der einzelnen Fixiermittel müssen einige wichtige praktische Winke gegeben werden, von deren Befolgung die Güte und die Brauchbarkeit der fixierten Objekte abhängig ist. Für Kern- und Plasmauntersuchungen ist es unbedingt notwendig, daß eine Vorprüfung des Materials erfolgt. Es sollen z. B. Kernteilungsstadien einer bestimmten Pflanze nachgewiesen werden, und zwar will der Beobachter solche gerne in den Pollenmutterzellen sehen. Das geeignete Stadium kann man der Blüte von außen nicht ansehen und bei wahlloser Fixierung könnte es vorkommen, daß die Pollenentwicklung in den Antheren bereits beendet ist und für den Beobachter wäre die Mühe des Fixierens dann vergeblich gewesen. Zur schnellen Prüfung entnimmt man der jungen Blütenknospe eine Anthere und zerdrückt sie auf dem Objektträger, der vorher mit einem großen Tropfen Methylgrün—Essigsäure (100 ccm destilliertes Wasser, 2 ccm Eisessig, 0,5 g Methylgrün) beschickt worden ist. Die Pollenmutterzellen

werden durch die Essigsäure sofort abgetötet und das Methylgrün färbt die chromatischen Anteile der Kerne in einigen Minuten grün. Mit Hilfe dieser schnellen Orientierungsfixierung wird es immer möglich sein, die beste Fixierungszeit und die brauchbaren Stadien in kurzer Zeit aufzufinden. Die Antherengröße z. B. gibt schon einen gewissen Anhalt für die Brauchbarkeit und es ist immer wertvoller, die Mühe einer sorgfältigen Auswahl nicht zu scheuen, als ein wahllos fixiertes Material durch die ganzen Stufen der Behandlung hindurchzuführen und später im Schnitt entdecken zu müssen, daß kein gutes Stadium vorhanden ist.

Soll das Objekt im Schnitt Bilder geben, die dem lebenden Zustand größtmöglichst angenähert sind, dann muß auch darauf geachtet werden, daß das Objekt im lebenden Zustand fixiert wird. Angewelkte oder gar verwelkte Pflanzenteile sind vollkommen unbrauchbar, weil durch das Welken eine Strukturveränderung des Plasmas eintritt, und diese Erscheinung kommt nachher in den Präparaten zum Vorschein. Beim Fixieren verfährt man am besten so, daß man ein Gläschen mit der Fixierungsflüssigkeit auf dem Arbeitsplatz stehen hat und jedes frei präparierte Objekt (z. B. eine Anthere) sofort ins Gemisch hineinwirft und nicht wartet, bis eine größere Zahl von Objekten herauspräpariert ist.

Die Fixierung muß sehr schnell vor sich gehen und Voraussetzung ist ein schnelles Eindringen der Flüssigkeit in die Gewebe. Viele der in den Fixiermitteln angewandten Flüssigkeiten haben aber ein geringes Diffusionsvermögen und in fallender Reihenfolge angeordnet ergibt sich folgendes: Die Säuren (Salpetersäure, Essigsäure usw.) dringen schnell ein, dann folgen Alkohol und Formol und am langsamsten wirken Osmiumsäure, Platinchlorid usw. Große Objekte sind zu vermeiden oder vorher mit einem scharfen Skalpell oder einer Schere zu zerteilen. Bei weicheren Objekten kann man eine Vorhärtung (2 Stunden Einwirkung des Fixiergemisches) vornehmen und dann zerteilen. Als weiterer, das Eindringen verhindernder Faktor kommt die Luft in den Geweben hinzu, die ein Schwimmen der Objekte auf der Fixierflüssigkeit hervorruft. Man bedient sich zur Entfernung dieser Luft einer Wasserstrahlluftpumpe, die das Fixierungsgefäß luftleer macht und den Geweben die Luft entzieht; beim Abschalten der Pumpe werden die Objekte sofort untersinken und das Gemisch umspült sie jetzt allseitig.

Die Menge der Fixierungsflüssigkeit muß sehr reichlich sein· das Objektvolumen muß um das 50—100fache übertroffen werden. Die in den Geweben enthaltene Flüssigkeit könnte sonst so auf das Gemisch einwirken, daß seine Zusammensetzung sich ändert und die beabsichtigte Wirkung bliebe dann aus. Auf Klarheit des Gemisches während der ganzen Fixierungsdauer ist streng zu achten; treten Trübungen auf, so muß eine Erneuerung erfolgen. Die einmal benutzte Lösung ist unbrauchbar.

Die Dauer der Fixierung ist abhängig vom Fixiergemisch, vom Objekt und von der beabsichtigten Wirkung; die Zeit entnehme man der Zusammenstellung der Fixiergemische auf S. 13. Ganz allgemein kann gesagt werden, daß eine zu kurze Fixierungszeit das Objekt nicht vollständig genug durchtränkt, eine zu lange aber auch ihre schweren Folgen hat; es treten Schrumpfungen auf, das Material wird brüchig und erweist sich später als schlecht färbbar.

Durch gelindes Anwärmen des Fixiergemisches kann das Eindringen schneller vor sich gehen, doch ist bei diesem Verfahren Vorsicht geboten, weil es leicht zur Plasmagerinnung kommen kann und die Objekte dadurch unbrauchbar werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden:

1. Nur ganz frisches Material fixieren.
2. Vorprüfung des Materials für zytologische Untersuchungen mit Methylgrün-Essigsäure ist notwendig.
3. Die Fixierung muß schnell vor sich gehen:
   a) nur kleine Objekte fixieren,
   b) größere Objekte zerteilen oder anstechen,
   c) Interzellularluft durch Evakuieren entfernen,
   d) das Eindringen durch gelindes Erwärmen befördern.
4. Die Menge der Fixierungsflüssigkeit muß das 50—100fache des Objektvolumens betragen.
5. Die Dauer der Einwirkung ist abhängig vom Fixiergemisch, vom Objekt und von der beabsichtigten Wirkung.

b) Einzelmittel

Alkohol. Soll Alkohol ohne jeden anderen Zusatz zum Fixieren benutzt werden, so muß er hochprozentig (96—100%ig), d. h. fast oder vollkommen wasserfrei sein. Der käufliche Alkohol ist nicht wasserfrei und durch Behandlung mit Kupfersulfat muß ihm das Wasser erst entzogen werden. Durch starkes Glühen in einem Porzellantiegel wird den blauen Kristallen des Kupfersulfats das Kristallwasser entzogen. Man erhält dann ein weißes Pulver, das in kleine Leinensäckchen geschüttet, in den Alkohol eingebracht wird. Das Kupfersulfat reißt das Wasser

begierig an sich und muß von Zeit zu Zeit erneuert werden. Wasserfrei ist der Alkohol dann, wenn man bei Zugabe von ein wenig Kalziumkarbid zum Alkohol keine Azetylengasentwicklung mehr bemerkt.

Der Alkohol dringt sehr rasch in die Gewebe ein und er gewährleistet auch eine gute Färbbarkeit, aber die durch die schnelle Wasserentziehung aus den Geweben hervorgerufene Schrumpfung zieht seiner Anwendung als Fixiermittel sehr enge Grenzen. Für anatomische Untersuchungen, wo es auf die Erhaltung der Feinheiten nicht ankommt, kann er gut Anwendung finden; zytologische Arbeiten schließen seine Anwendung aus. Zum Fixieren müssen große Mengen — das 50- bis 100fache des Objektvolumens — verwandt werden; Einwirkungsdauer 24 Stunden.

In Fixiergemischen (vgl. Carnoy) ist der Alkohol zum Härten häufig unentbehrlich, weil erst durch seine, jetzt freilich abgeschwächte Wirkung die Objekte schneidbar werden. Später wird noch auf den Alkohol als Konservierungs- und Durchgangsflüssigkeit zum Einbetten und Einschließen hingewiesen werden (S. 16).

Essigsäure. Die reine konzentrierte Essigsäure wird Eisessig genannt (100%ig); die oft unter derselben Bezeichnung verstandene konzentrierte Essigsäure des deutschen Arzeneibuches ist nur 96%ig.

Essigsäure wird für sich allein zum Fixieren wenig benutzt, da sie auf Kerne und Plasma verschiedene Wirkungen ausübt; die Kerne werden gut fixiert, das Plasma schlecht. In einer 8—10%igen Lösung kann man sie zum Fixieren gebrauchen; auswaschen mit Wasser. Zum schnellen Abtöten und Fixieren kleinerer Objekte verwendet man 1—2%ige Essigsäure. Wichtiger ist sie in Fixiergemischen zum Ansäuern, weil sie sehr schnell in das Gewebe eindringt, den Kern fixiert und keine Schrumpfungen hervorruft.

Chromsäure. Die Substanz ist hygroskopisch, zerfließt sehr leicht. Zu empfehlen ist die Aufbewahrung als ½—1%ige wässerige Lösung. Ohne Zumischung fixiert die Chromsäure das Plasma schlecht, die Kerne gut. Für kleine Organismen (Blaualgen und Grünalgen) und Schnitte kann man die wässerige Lösung gut benutzen. Nach 24stündiger Einwirkung wird in fließendem Wasser ausgewaschen. Bei der Anwendung von Alkohol muß im Dunkeln ausgewaschen werden, da sich sonst Niederschläge bilden.

Pikrinsäure. Die Anwendung erfolgt meistens in Gemischen oder als gesättigte wässerige (1%ige) Lösung oder gesättigte alkoholische (6—7%ige) Lösung. Pikrinsäure dringt sehr schnell in die Objekte ein und eine Fixierdauer von 24 Stunden dürfte immer genügen. Das Auswaschen mit Wasser schadet den Objekten (Zerfall) und darf höchstens 10 Minuten dauern. Man überträgt gleich in 70%igen Alkohol, dem einige Tropfen einer Lithiumkarbonatlösung zugesetzt sind. Bei häufigem Wechsel des Alkohols wird die Lösung der Pikrinsäure schneller vor sich gehen.

Sublimat. Sublimat kann allein angewandt werden, doch wirken die Gemische viel besser. Allein angewandt muß mit konzentrierter wässeriger (1: 15—16) oder konzentrierter alkoholischer (1: 3) Lösung gearbeitet werden. Die Lösungen dürfen nicht mit eisernen Geräten (Nadeln, Pinzetten usw.) in Berührung kommen, da Niederschläge entstehen, die die Fixierung ungünstig beeinflussen. Man benutze zum Arbeiten Horn- oder Porzellanspatel, Federkiele, Glasstäbe, Glasnadeln usw. — Die Fixierungsdauer richtet sich nach der Größe der Objekte und schwankt zwischen 1 und 24 Stunden.

Das Sublimat muß aus den Objekten ganz sauber ausgewaschen werden, weil selbst geringe zurückgebliebene Sublimatspuren Niederschläge erzeugen, die zu Täuschungen und Verwechslungen Anlaß geben können. Zum Auswaschen verwendet man 70%igen Alkohol, dem man bis zur Hellbraunfärbung (Kognakfarbe!) Jodjodkalium zusetzt (Jodtinktur ist nicht zu empfehlen!). Ist die Bräunung der Lösung verschwunden, so erfolgt neuer Zusatz von Alkohol und Jodjodkalium. Die Waschflüssigkeit wird so lange erneuert, bis keine Verfärbung mehr eintritt, also alles Sublimat entfernt ist. Durch reinen Alkohol wird dann das Jod aus den Geweben wieder herausgelöst. — Die Färbbarkeit der so behandelten Objekte ist gut.

Kaliumbichromat. Als guter Plasmafixierer ist es in Gemischen sehr geschätzt und findet besonders bei Chondriosomenstudien Verwendung; allein angewandt ist es unbrauchbar.

Platinchlorid. In 1%iger Lösung angewandt ist es das beste unter den Einzelmitteln, weil keine Schrumpfungen vorkommen, die Kerne gut fixiert werden und nur das Plasma eine netzige Struktur erhält. Es dringt aber nur sehr langsam in die Gewebe ein und ist sehr teuer. Kisser (1926) erzielte mit der 1%igen Lösung bei Wurzelspitzen gute Resultate.

Formol (Formalin). Die käufliche 40%ige wässerige Lösung des Gases Formaldehyd ist Formol oder Formalin. Als Konservierungsmittel spielt diese Lösung eine große Rolle, wird jedoch zum Fixieren nur in Gemischen angewandt. Es härtet die Gewebe ziemlich stark, erhält das Plasma meist unverändert, wirkt jedoch verändernd auf die Kernstruktur ein. — Beim Arbeiten mit Formalin hüte man Hände und Augen! Die Haut wird stark gehärtet und die Dämpfe rufen Schleimhautentzündungen hervor.

Osmiumsäure. Die Bezeichnung „Osmiumsäure" hat sich allgemein durchgesetzt, trotzdem sie keine Säure ist, sondern Osmiumtetroxyd (OsO_4), dessen wässerige Lösung neutral reagiert. Sie wird in kleinen, verschmolzenen Röhrchen von $^1/_{10}$—1 g Inhalt in den Handel gebracht.

Die Osmiumsäure ist das beste Plasmafixiermittel, das wir besitzen; sie kommt sowohl in wässerigen Lösungen als auch in vielen Gemischen zur Anwendung (vgl. unter c). Bei der Fixierung ist darauf zu achten, daß

nur kleine Objekte genommen und diese mit Hilfe der Pumpe luftfrei gemacht werden, damit die schwer eindringende Lösung schneller ihre Wirkung ausüben kann. Die Färbbarkeit der Objekte wird durch Schwärzung häufig sehr stark herabgedrückt und erst nach der Anwendung von Bleichmitteln kann zur Färbung geschritten werden. (Vgl. S. 7.) Man fixiert im 3—4fachen Volumen des Objektes 24—48 Stunden und wäscht dann in fließendem Wasser aus.

c) Fixiergemische

Flemmingsche Gemische (Chromsäure — Osmiumsäure — Essigsäure). Die Gemische werden in zwei verschiedenen Stärkegraden verwandt. Sie gehören zu den besten Fixiermitteln (Plasma und Kernteilungen). Sie dringen aber außerordentlich langsam ein und können deshalb nur Anwendung finden bei kleinen Objekten von nicht über 2—3 mm Seitenlänge.

Osmiumsäure bezieht man fertig in kleinen Mengen in zugeschmolzenen Glasröhrchen, die man zur Herstellung der Lösung in eine größere Flasche mit Glasstopfen wirft. Durch kräftiges Schütteln der Flasche zerbricht das Röhrchen und die ausfließende Osmiumsäure wird nun mit 25 ccm destilliertem Wasser vermischt. Zur vollständigen Lösung sind 12—15 Stunden erforderlich und während dieser Zeit stellt man die Flasche ins Dunkle (braune Flasche benutzen); dann können die übrigen Bestandteile hinzugesetzt werden. Vorteilhafter ist es, sich die Lösung je nach Bedarf von einem Apotheker ansetzen zu lassen.

Die Bonner Mischung (Sieben, 1913) setzt sich folgendermaßen zusammen:

a) das schwächere Gemisch (Mittelflemming): 180 ccm 1%ige Chromsäure, 25 ccm 2%ige Osmiumsäure, 12 ccm Eisessig, 210 ccm dest. Wasser;

b) die stärkere Lösung: 15 ccm 1%ige Chromsäure, 2 ccm 2%ige Osmiumsäure, 1 ccm Eisessig, 10 ccm destill. Wasser.

Die schwächere Lösung eignet sich gut für kleine Objekte (Antheren, Fruchtknoten, Wurzelspitzen, Moose und andere Kryptogamen). Größere Objekte (Blätter, Gefäßbündel, Samenanlagen, Fruchtknoten, größere Wurzeln usw.) fixiert man zweckmäßig mit der unter b) angegebenen Lösung. Eine besondere Vorbereitung der Objekte ist meistens nicht notwendig, doch präpariere man so weit wie möglich frei; Anstechen und Zerschneiden zum Zweck des besseren Eindringens ist erwünscht.

In der Flüssigkeit, die das 3—5fache des Objektvolumens betragen soll, bleiben die Objekte 24—48 Stunden. Nachdem gründlich in fließendem Wasser ausgewaschen worden ist (1½—2 Stunden), können die Objekte gleich weiter verarbeitet oder bis zum Zeitpunkt der Verarbeitung konserviert werden.

Ganz kleine Objekte (Algen, Schwärmsporen usw.) fixiert man nicht mit der Flüssigkeit, sondern mit Osmiumsäuredämpfen. Es ist dabei gleichgültig, ob man das Gemisch oder wässerige Lösungen verwendet. Die Objekte werden in einem kleinen Tropfen Wasser auf den Objektträger gebracht und dieser so auf den Hals der Flasche mit Osmiumsäure gelegt, daß der Tropfen nach unten hängt. Die aus der Flasche aufsteigenden Dämpfe fixieren das Objekt in wenigen Augenblicken. Nach Lidforss (vgl. Schneider-Zimmermann 1922) soll sich dieses Verfahren auch bei älteren Zellen mit Vakuolen und hohem Turgor bewähren. Man stellt Handschnitte von solchen Geweben her und hält sie mit der Pinzette 5—15 Sekunden über einer 2%igen Osmiumsäurelösung, überführt dann in 10%igen Alkohol und in Abständen von etwa 5 Minuten durch die Alkoholreihe (S. 15) bis zum absoluten Alkohol.

Die Osmiumsäure hat aber die Eigenschaft, daß sie die Gewebe, besonders solche, die Fett enthalten, leicht schwärzt. Für die nachfolgende Färbung ist diese Erscheinung recht unerwünscht und vor dem Einbringen in die Farbe müssen die Schnitte noch gebleicht werden. Man benutze dazu das käufliche 3%ige Wasserstoffsuperoxyd in reiner Lösung oder verdünne es mit 70—80%igem Alkohol.

Carnoysches Gemisch (Alkohol-Eisessig): 80 ccm abs. Alkohol und 20 ccm Eisessig.

Der Eisessigzusatz zum Alkohol erfolgt, um die starke Schrumpfung abzuschwächen, die der Alkohol, allein angewandt, hervorrufen würde. Das oben angegebene Gemisch kann beliebig verändert werden, z. B. 75 ccm absoluter Alkohol und 25 ccm Eisessig; auch der Zusatz von Chloroform nach folgender Zusammensetzung ist gebräuchlich: 6 T. abs. Alkohol, 1 T. Eisessig, 3 T. Chloroform.

Das Gemisch dringt sehr gut in die Objekte ein, verleiht ihnen eine gute Färbbarkeit und ist für die Untersuchung von Kernen und Kernteilungsstadien gut zu gebrauchen; das Plasma wird jedoch nicht so gut fixiert und feinere Objekte erleiden häufig Schrumpfungen. Größere und festere Objekte, die dem Eindringen des Flemmingschen Gemisches bedeutenden Widerstand entgegensetzen, fixiert man vorzugsweise mit diesem Gemisch. Embryologische Studien und Gefäßbündeluntersuchungen können erfolgreich durchgeführt werden.

Die Objekte müssen 24 Stunden fixiert und darauf so lange in Alkohol ausgewaschen werden, bis sich kein Eisessiggeruch mehr bemerkbar macht.

Juelsches Gemisch I. (Chromsäure—Platinchlorid—Eisessig): 25 ccm 2%ige Chromsäure, 2,5 g 10%iges Platinchlorid, 1 ccm Eisessig, 75 ccm dest. Wasser.

Das Gemisch fixiert junge und großzellige Gewebe, junge Antheren und Embryosäcke sehr gut, versagt jedoch z. T. bei älteren Objekten. Man läßt das Gemisch 24—48 Stunden einwirken und verfährt dann wie bei den Flemmingschen Lösungen.

Juelsches Gemisch II (Zinkchlorid—Eisessig—Alkohol): 2 g Zinkchlorid,

2 ccm Eisessig, 100 ccm 50%iger Alkohol (nach Sieben besser 80%iger Alkohol).

Das Gemisch hat vor Juel I den Vorzug, daß es auch in ältere Objekte gut und schnell eindringt (Samenanlagen, Blätter, Gefäßbündel usw.); es gleicht in seiner Wirkung also dem Carnoyschen Gemisch. Ausgewaschen wird mit 80%igem Alkohol, den man 3—4mal wechselt.

Pfeifferssches Gemisch besteht aus gleichen Teilen Formol, Holzessig und Methylalkohol. Die Mischung dringt gut ein und ist in erster Linie für Algen bestimmt, die darin gleichzeitig fixiert und konserviert werden. Mit gutem Erfolg ist es auch bei Hefen und Koniferen (Archegoniaten) angewandt worden. Die Objekte werden in 50%igen Alkohol übertragen.

vom Rathsches Gemisch (Pikrinsäure—Osmiumsäure—Eisessig): 100 ccm gesättigte wässerige Pikrinsäurelösung, 6 ccm 2%ige Osmiumsäure, 2 ccm Eisessig.

Das Gemisch ist für jüngere und ältere Objekte gleich gut anwendbar (Antheren, Samenanlagen, Gefäßbündel, Wurzelspitzen usw.), es fixiert die Kerne gut und gewährleistet eine annehmbare Färbbarkeit der Gewebe. Fixierungsdauer 24—48 Stunden.

Durch Zusatz von Platinchlorid erhält man eine zweite Mischung, die als eine der besten Fixierungsmittel gilt und eine vorzügliche Färbbarkeit veranlaßt: 200 ccm gesättigte wässerige Pikrinsäurelösung, 1 g Platinchlorid gelöst in 100 ccm dest. Wasser, 2 ccm Eisessig, 12 oder 25 ccm 2%ige Osmiumsäurelösung.

Bei beiden Fixierungen erfolgt eine Gelbfärbung der Objekte durch die Pikrinsäure. Man wäscht deshalb 10 Minuten in Wasser aus und überträgt dann in 70%igen Alkohol, dem man zur Entfärbung einige Tropfen einer gesättigten wässerigen Lösung von Lithium carbonicum zugesetzt hat.

Kaisers Sublimat-Eisessig-Gemisch: 10 g Sublimat, 3 g Eisessig, 300 g dest. Wasser.

Das Gemisch ist für zytologische Studien wenig geeignet, da Plasma und Zellkern durch die Fixierung angegriffen werden; gut geeignet ist es für die fleischigen Fruchtkörper der Pilze, die man aber nur so lange im Gemisch läßt, bis eine vollkommene Durchtränkung erfolgt ist. Siehe Sublimat S. 10.

Zenkersches Gemisch (Sublimat — Kaliumbichromat — Natriumsulfat — Eisessig): 2—2½ g Kaliumbichromat, 1 g Natriumsulfat, 100 ccm Wasser, 5 g Sublimat, 5 ccm Eisessig.

Einwirkungsdauer bis zu 24 Stunden, Auswaschen mit fließendem Wasser und Weiterbehandlung nach den für Sublimatgemischen vorgeschriebenen Regeln. Die Kerne werden gut fixiert und eine brauchbare Färbbarkeit erzielt.

d. Fixiergemische für Chondriosomen

Im Zytoplasma der Zellen lassen sich meistens in der Nähe der Zellkerne stark lichtbrechende Gebilde beobachten, die die Form von Kügelchen, Stäbchen, Spindeln oder Fäden haben. Da sie in verschiedener Hinsicht mit den Chondriosomen embryonaler tierischer Zellen verglichen werden können, hat man sie auch in der Botanik „Chondriosomen" genannt. Die Fixiermittel wirken ganz verschieden auf diese Gebilde ein und nur nach Anwendung bestimmter Gemische gelingt die Sichtbarmachung durch die Farbe. Alkohol und Essigsäure zerstören diese Gebilde; Formalin, Chromsäure, Osmiumsäure und Kaliumbichromat wirken dagegen nicht angreifend. Alkohol und Essigsäure dürfen daher in den Fixiergemischen nur in ganz geringen Mengen vorhanden sein.

Nach Benda: 15 ccm 1%ige Chromsäure, 4 ccm 2%ige Osmiumsäure, 3 bis 5 Tropfen Eisessig.

Die Objekte werden nach fünftägiger Einwirkung des Gemisches mit Wasser ausgewaschen. Weiterbehandlung wie beim Flemmingschen Gemisch (S. 11).

Nach Regaud: 80 ccm Kaliumbichromat, 20 ccm Formol.

Das Gemisch muß 4 Tage einwirken und für die Fixierung jedesmal neu bereitet werden. Eine Nachbehandlung mit reinem, 3%igen Kaliumbichromat (einige Tage bis zu einer Woche) wird von Regaud empfohlen; dann auswaschen in fließendem Wasser.

Nach Sapĕhin: Eine Modifizierung des Regaudschen Gemisches, die besonders zuverlässig sein soll. Man mische gleiche Teile einer 2%igen Kaliumbichromatlösung und 10%iges Formol. Einwirkungsdauer vier Tage bei täglicher Erneuerung des Gemisches, Nachbehandlung mit 2%iger Kaliumbichromatlösung und Auswaschung im fließenden Wasser.

Tabelle der wichtigsten Fixiermittel und und Fixiergemische siehe Seite 13.

9. Das Auswaschen

In der Tabelle der Fixiermittel wurden bereits die Einwirkungsdauer und die Wässerungsflüssigkeit angegeben, denn nicht alle Objekte vertragen eine unbeschränkt lange Einwirkung des Gemisches. Die Überführung der Objekte zur Reinigung vom Fixiergemisch ist unbedingt notwendig und die vorgeschriebenen Zeiten müssen streng innegehalten werden. Durch längere Einwirkung werden die Objekte brüchig, bestimmte aus den Fixiergemischen sich abscheidende Stoffe lagern sich als Kristalle ab und die spätere Bearbeitung wird dadurch häufig unmöglich gemacht oder es ergeben sich nur sehr unzulängliche Resultate.

In der Regel ist es also notwendig, die Objekte nach beendeter Fixierung auszuwaschen. Wurde mit einer wässerigen Lösung fixiert, dann wird auch in Wasser ausgewaschen; alkoholische Lösungen verlangen Alkoholauswaschung, und zwar mit der

Tabelle der wichtigsten Fixiermittel und Fixiergemische:

Fixiermittel und Fixiergemische	Objekte	Dauer der Einwirkung in Stunden	Auswaschen in	Überführen und Konservierung
Flemmingsche Gemische				
a) Mittelflemming	Antheren, Fruchtknoten, Wurzelspitzen	24—48	Wasser 1-2 Stunden	Alkoholreihe → 96% Alkoh.
b) starke Lösung	Große Wurzelspitzen, Samenanlagen, Blätter, Gefäßbündel	24—48		
Carnoysches Gemisch	Gefäßbündel, Embryosackuntersuchungen. — Speziell Farne	24	Alkohol	96% Alkohol
Juel I	Pollenmutterzellen, ältere Objekte, Farne	24—48	Wasser	Alkoholreihe → 96% Alkohol
Juel II	Junges Gewebe, Samenanlagen	24	Alkohol 80%	96% Alkohol
Pfeiffersches Gemisch	Algen, Hefen, Koniferen	24	40—50%igem Alkohol oder Konservierung im Gemisch	das Gemisch konserviert oder Alkoholreihe → 96% Alkoh.
vom Rathsches Gemisch	Ältere und jüngere Objekte, Pollenkörner, Gefäßbündel, Fruchtknoten	24—48	Wasser 10 Minuten, dann 70%iger Alkohol	96% Alkohol
Kaisers Sublimat-Eisessig-Gemisch .	Pilze, junge Objekte	nicht länger als bis zur vollständig. Durchtränkung	Wasser + Jodjodkalium oder Alkoh. 70% + Jodjodkalium	96% Alkohol
Fixiergemische nach Benda	Chondriosomen	120	Wasser	Alkoholreihe → 96% Alkoh.
,, Regaud		96		
,, Sapĕhin		96		
Zenkers Gemisch ...	Antheren, Samenanlagen, Wurzelspitzen	bis 24	Wasser	Alkoholreihe → 96% Alkoh.
Alkohol	Für alle Objekte brauchbar, die anatomischen Untersuchungen dienen sollen	24	—	96% Alkohol
Chromsäure		24	Wasser	Alkoholreihe → 96% Alkohol
Pikrinsäure		24	Wasser 10 Minuten, dann 70%iger Alkohol	96% Alkohol
Sublimat		1—24	Wie bei Kaisers Sublimat-Eisessig	

Konzentrationsstufe des Alkohols, die auch im Fixiergemisch enthalten ist. — Beim Auswaschen mit Wasser, das in zwei Stunden beendet ist, setzt man die Objekte direkt dem Wasserstrom aus. Einmal wird dadurch dauernd frisches Waschwasser zugeführt und zweitens bleiben die Objekte in Bewegung und werden allseitig umspült. Das Fortschwimmen kleinerer Objekte kann durch besondere Vorrichtung verhindert werden. Die Fairchildschen Siebeimerchen sind für kleine Objekte sehr gut brauchbar (Abb. 6). Sie bestehen aus Glas oder Ton, können durch einen Stopfen verschlossen werden und sind allseitig mit Poren versehen, die zum Aus- und Einströmen des Wassers dienen. Die mit den Objekten beschickten Eimerchen werden durch den Kork verschlossen und in einer Schale dem fließenden Wasser ausgesetzt; die Korken bewirken ein dauerndes Schweben an der Wasseroberfläche. Mit Hilfe dieser Eimerchen können viele verschiedene Objekte gleichzeitig gewässert werden.

Aus kleinen Glasröhrchen, die an beiden offenen Enden umgekrempelt sind, kann man sich übrigens selbst Wässerungsröhren herstellen. Über die Enden werden feinmaschige Stoffgewebe mit Hilfe von Gummi-

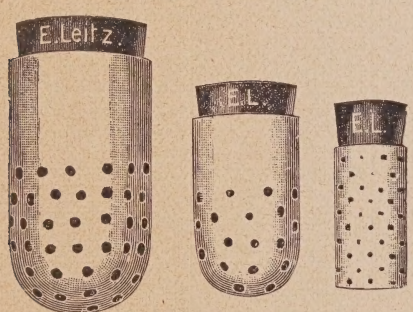


Abb. 6. Fairchildsche Siebeimerchen

ringen gespannt und das Auswaschen geht dann genau so vor sich, wie bei den Siebeimerchen.

Schaffnit entwässert mit seinem Apparat direkt unter der Leitung (Abb. 7). Man sprengt von einer kleinen, enghalsigen Flasche den Boden ab und überspannt die Öffnung mit Müllergaze. Je nach der Größe führt man die Objekte durch den Hals oder von unten her ein. Ein Stück Gummischlauch zieht man mit dem einen Ende über den Hals und befestigt es mit Bindfaden oder Draht, während man das andere an einem Wasserleitungshahn befestigt. Nun dreht man die freischwebende Waschvorrichtung um, füllt sie durch Aufdrehen des Hahnes zur Hälfte mit Wasser und kippt sie wieder um. Auf diese Weise bleibt infolge des Luftdruckes das Wasser immer konstant.

Kisser (1926) beschreibt noch folgende recht brauchbare Wässerungseinrichtung: „Kleine Glasschalen (Kristallisierschalen) mit senkrechten Wänden werden mit einer gut schließenden Glasscheibe, die in der Mitte ein kleines kreisrundes Loch besitzt, bedeckt. Nach Einbringung der Objekte in das Schälchen wird durch das Loch ein dünner Strahl der Wasserleitung einfließen gelassen. Das hereinströmende Wasser drängt die Objekte gegen den Rand der Schale und wirbelt sie dort hin und her, während das überschüssige Wasser durch das Loch wieder abläuft, die Objekte aber gegen den Rand gedrängt bleiben. Will man verschiedene Objekte auf einmal auf diese Art auswaschen, so schaltet man an die Wasserleitung einen einseitig abgeschlossenen horizontalen Arm aus Metall oder Glas mit vielen in Röhrchen mündenden Ausflußöffnungen an. In einem mit Abfluß versehenen Kasten aus Zinkblech werden die einzelnen Schälchen entsprechend verteilt."

Abb. 7. Auswaschapparat nach Schaffnit

10. Das Entwässern und Härten

Die nach der Fixierung ausgewaschenen Objekte müssen entwässert werden und die mit Alkohol vorzunehmende Entwässerung ist aus verschiedenen Gründen notwendig. Das Material soll später meistens in Paraffin oder Zelloidin geschnitten werden und muß vollkommen wasserfrei sein, da diese Stoffe sich nicht mit Wasser mischen. Vor dem Schneiden müssen die Objekte aber auch noch gehärtet werden, weil sie sonst eine Zerlegung in feine Schnittserien nicht gestatten und der zum Entwässern gebrauchte Alkohol dient auch so gleichzeitig zum Härten.

Schon vorher wurde gesagt, daß Alkohol das beste Entwässerungsmittel sei und der Gang der Behandlung soll nun kurz beschrieben werden. Die Objekte dürfen, wenn sie aus dem Waschwasser herauskommen, nicht sofort in einen hochprozentigen Alkohol übertragen werden, da durch zu schnellen Wasserentzug Gewebespannungen entstehen. Es stellen sich dann Schrumpfungen ein, die sich im weiteren Verlauf der Arbeit unliebsam bemerkbar

Berichtigung:

In der Tabelle zur Bereitung der Alkoholstufen (S. 15) sind die Zeilen von „oder in einer Gleichung ausgedrückt“ bis „zu erhalten“ zu streichen!

machen. Manche, auf schlechte Fixierung zurückgeführte Mißerfolge liegen eigentlich in unvorsichtigem Entwässern begründet. Die Alkoholkonzentration muß ganz langsam gesteigert werden. Nach dem Abgießen des letzten Waschwassers werden die Objekte in einen 10%igen Alkohol überführt und zwei Stunden darin belassen. Die weitere Überführung in 30-, 50-, 70-, 80-, 90- und 96%igen Alkohol erfolgt in den gleichen Zeitabständen. Der 96%ige Alkohol muß 24 Stunden einwirken und innerhalb dieser Zeit einmal gewechselt werden. Die letzte Stufe wäre dann der absolute Alkohol und auch hier wird ein Wechsel nach 12 Stunden sich noch empfehlen.

Die Zeit der Einwirkung richtet sich bis zu einem gewissen Grade nach der Größe der Objekte und sie kann von Fall zu Fall variiert werden, doch ist dies nur eine Frage der Erfahrung. Öfteres Umschütteln während des Entwässerns befördert das Eindringen des Alkohols in die Objekte. Wenn irgend möglich, vereinige man nicht zu viel Material in einem Glase, sondern führe kleine Mengen getrennt durch die Alkoholreihe hindurch.

Die verschiedenen Alkoholstufen werden in Flaschen vorrätig gehalten und aus der beigefügten Tabelle mit dem Beispiel kann man sich die zur Bereitung der Alkoholstufen nötige Formel ableiten:

Gewünschte Stärke in Volum-Prozenten	Prozentgehalt des zu verdünnenden Alkohols												
	95%	90%	85%	80%	75%	70%	65%	60%	55%	50%	45%	40%	35%
90	6,50												
85	13,36	6,56											
80	20,16	13,79	6,83										
75	29,66	21,89	14,48	7,20									
70	39,16	31,05	23,14	15,35	7,64								
65	50,66	41,53	33,03	24,66	16,37	8,15							
60	63,16	53,65	44,48	35,44	26,47	17,58	8,76						
55	78,36	67,87	57,90	48,07	38,32	28,63	19,02	9,47					
50	96,36	84,71	73,90	63,04	52,43	41,73	31,25	20,47	10,35				
45	117,86	105,34	93,30	81,38	69,54	57,78	46,09	34,46	22,90	11,41			
40	144,86	130,80	117,34	104,01	90,76	77,58	64,48	51,43	38,46	25,55	12,8		
35	178,86	163,28	143,01	132,88	117,82	102,84	87,93	73,08	58,31	43,59	27,6	14,3	
30	224,4	206,22	188,57	171,05	153,61	136,04	118,94	101,71	84,54	67,45	50,6	33,4	16,8

Beispiel: Aus 90%igem Alkohol will man 70%igen erhalten: Man sucht die Vertikalreihe des 90%igen Alkohols, verfolgt sie abwärts bis zur Horizontalreihe des 70%igen Alkohols; an dieser Kreuzungsstelle steht die Zahl 31,05; man muß also 31,05 Raumteile (ccm) Wasser zu 100 Raumteilen (ccm) 90%igem Alkohol hinzusetzen, um 70%igen zu erhalten, oder in einer Gleichung ausgedrückt, nach der man sich auch **ohne** Tabelle helfen kann: 100 : 90 = x : 70, wobei x den Raumteilen des 90%igen Alkohols entspricht und (100—x) = Raumteile Wasser bedeuten, die zur Verdünnung zugesetzt werden müssen, um 100 ccm 70%igen Alkohol zu erhalten.

Bei sehr kleinen und feinen Objekten kann man folgendermaßen verfahren: Die Objekte werden in ein Uhrschälchen mit stark verdünntem Alkohol gebracht und in eine Glasdose gesetzt, die eine kleine Menge hochprozentigen Alkohols enthält. Die Dose wird gut verschlossen. Innerhalb von 24 Stunden werden sich die Konzentrationsunterschiede der beiden Alkohole so ausgeglichen haben, daß sich die Objekte in hochprozentigem Alkohol befinden. Der Vorgang kann nach Belieben wiederholt werden. Auch die durch Membranen erfolgende Diffusion kann angewendet werden. Man bringt die Objekte in ein Röhrchen, das unten mit einem Papierstreifen verklebt ist und füllt mit einem schwachprozentigen Alkohol auf. Das untere Ende der Röhre wird dann in ein Gefäß mit hochprozentigem Alkohol eingehängt. Auf osmotischem Wege wird das Wasser verdrängt und nach 24 Stunden befinden sich die Objekte in hochprozentigem Alkohol.

Die Entwässerung kann auch mit Glyzerin eingeleitet und mit Alkohol beendet werden. Diese Methode ist für solche Objekte sehr zu empfehlen, die leicht zu Schrumpfungen neigen. Man führt die Entwässerung so durch, daß man die Objekte zunächst in eine 5—10%ige wässerige Glyzerinlösung überträgt und das offene Gläschen vor Staub geschützt unter einer Glasglocke stehen läßt.

Das Wasser wird langsam verdunsten und die Lösung immer steigend konzentrierter. Die Übertragung in 96 %igen oder absoluten Alkohol kann danach ohne Gefahr einer Schrumpfung erfolgen.

Im Abschnitt über das Auswaschen (S. 12) wurde schon auf das Auswaschen solcher Objekte hingewiesen, die in alkoholischen Fixiergemischen abgetötet worden sind. Nachdem diese Objekte mit dem Alkohol, der der Alkoholkonzentration des Fixiergemisches entspricht, ausgewaschen sind, führt man sie weiter durch die Alkoholreihe bis zum 96 %igen und absoluten Alkohol hindurch.

11. Das Konservieren

Häufig ist es so, daß größere Materialmengen eingesammelt werden, die nicht sofort verarbeitet werden können. Sie müssen daher in einem Gemisch aufbewahrt werden, das die Objekte nicht schädigt, sie andererseits aber auch nicht härtet und dadurch die Weiterarbeit schwierig macht. Die Wahl der Konservierungs-Flüssigkeit richtet sich nach dem Zweck der Untersuchung. Handelt es sich um Untersuchungen des Zellinhaltes, dann soll möglichst nicht konserviert werden; die Objekte werden gleich bis zur Einbettung gebracht und sind hier vor jeder Schädigung sicher. Bei einfachen morphologischen und anatomischen Untersuchungen, wo es auf den Zellinhalt nicht so sehr ankommt, kann man die Objekte in 70—80 %igem Alkohol konservieren. Die Objekte werden durch die ganze Alkoholreihe bis zum absoluten Alkohol hindurchgeführt und in 70—80 %igen Alkohol zurückübertragen. Die Konservierung in Alkohol, so einfach und angenehm sie ist, hat aber auch den Nachteil, daß die Objekte hart und brüchig werden. Bis zu einem gewissen Grade kann die Härtung entfernt werden, wenn man das Material vor der Weiterverarbeitung wieder durch die Alkoholreihe bis zum Wasser zurückbringt. Die Objekte werden einige Stunden geweicht und umgekehrt wieder die Alkoholreihe aufwärts geführt. Die Härtung verschwindet dadurch zu einem guten Teil und die Objekte bleiben weicher und schneidbarer. Auch das Strasburger-Flemmingsche Aufbewahrungsgemisch ist zu empfehlen. Es besteht aus 1 T. abs. Alkohol, 1 T. Glyzerin und 1 T. dest. Wasser. Durch Glyzerinzusatz verliert der Alkohol seine härtenden Eigenschaften, die Objekte bleiben geschmeidig. Soll das Material weiter verarbeitet werden, dann überträgt man in 70 %igen Alkohol und führt in der steigenden Alkoholreihe die Entwässerung weiter durch.

Frisches Material für anatomische Untersuchungen kann in Alkohol konserviert und gleichzeitig fixiert werden. Man beginnt zweckmäßig mit einer niedrigen Alkoholkonzentration (30 %ig) und steigert langsam bis zum 96 %igen Alkohol. Bei manchen Objekten tritt Bräunung auf (z. B. beim Fichtenspargel (*Monotropa*), die aber durch späteres Bleichen wieder entfernt werden kann. Objekte, deren Farbe erhalten werden soll, dürfen nicht in Alkohol konserviert werden.

Formalin ist weniger flüchtig als Alkohol und findet in 1—4 %iger Lösung (käufliches Formol mit 9 Teilen Wasser verdünnen) Anwendung. Die Objekte werden aber sehr stark gehärtet und die Härtung läßt sich nicht so leicht rückgängig machen wie beim Alkohol. Die Nachbehandlung zur Enthärtung mit 10 %iger Zitronensäure nimmt 14 Tage in Anspruch und ist kaum zu empfehlen. Dem Alkohol gegenüber hat es den Vorteil, daß saftige Gewebe nicht schrumpfen und die Farbe der Objekte nur sehr langsam verschwindet. Das Arbeiten mit Formalin ist wegen des schlechten Geruchs recht unangenehm, außerdem werden die Schleimhäute der Nase und des Mundes sehr stark gereizt.

Kampferwasser wird für die Konservierung von Algen bevorzugt. Die Objekte werden in Süß- oder Salzwasser mit Zusatz von einigen Kampferstücken in gut verschließbaren Gläschen aufbewahrt.

Jedes Konservierungsmittel hat seine Vor- und Nachteile und die sicherste Methode zur Erhaltung der Objekte — sofern sie mit dem Mikrotom geschnitten werden sollen — ist die, sofort zur Paraffineinbettung zu schreiten.

12. Das Schneiden von uneingebettetem Material mit dem Mikrotom

Alle später zu beschreibenden Einbettungsmethoden sind kompliziert, erfordern viel Geduld und kosten Zeit; deshalb sollte es die Regel sein, daß alle Objekte, die einer Untersuchung ohne besondere Einbettung zugänglich sind, auch mit Hilfe der Freihandtechnik untersucht werden. Hier soll nochmals auf das Schneiden von uneingebettetem Material eingegangen werden, jedoch tritt an die Stelle der schneidenden Hand das Mikrotom. Objekte, die über eine genügende Konsistenz verfügen, können ohne oder mit ganz einfachen Einbettungsmethoden schon in so feine Schnitte zerlegt werden, daß alle zu beobachtenden Einzelheiten ganz klar hervortreten.

Hölzer gehören zu den Objekten, die sich zumeist ohne besondere umständliche

Vorbereitung mit dem Mikrotom schneiden lassen. Ist das Holz sehr spröde, so daß man beim Schneiden das Mikrotommesser beschädigen würde oder fürchten müßte, nur zersplitterte Schnitte zu erhalten, so setzt man das Objekt strömendem Wasserdampf aus oder kocht es in Wasser mit etwas Glyzerinzusatz; das Holz wird durch diese Behandlung gut schnittfähig. Zum Schneiden spannt man das Objekt in die Objektklammer ein und schneidet mit quergestelltem Messer. Da der trockene Schnitt sehr stark am Mikrotommesser haften würde, wird das Objekt vor dem Schneiden für kurze Zeit in Glyzerinalkohol eingelegt; während des Schneidens muß die Schnittfläche durch Betupfen mit Alkohol dauernd feucht gehalten werden. Auch das Mikrotommesser wird mit Alkohol angefeuchtet, damit die Schnitte auf dem Messer schwimmen und mit einem Pinsel leicht abgehoben werden können. Beim Befeuchten des Messers geht man so vor, daß man einen größeren mit Alkohol gefüllten Pinsel am Messerrücken abstreift; der Alkohol läuft dann die Messerbreite herab und breitet sich gleichmäßig an der Schneide aus. Entfettet wird das Mikrotommesser mit Benzol oder Xylol und nachgewaschen mit Alkohol. Bei Beachtung der angegebenen Vorbereitungen können Querschnitte von Hölzern in einer Stärke von 10—20 μ gewonnen werden. Die auf dem Messer in Alkohol schwimmenden Einzelschnitte nimmt man mit einem weichen Pinsel ab und überträgt sie in ein Uhrschälchen. Die ganze Operation des Färbens usw. kann in den Uhrschälchen vorgenommen werden und erst der fertige Schnitt wird zum Einschluß in Harz auf den Objektträger gebracht

So konsistente Objekte wie die Hölzer bieten wenig Schwierigkeiten beim Schneiden; sie sind als Versuchsobjekte für diese Technik gut geeignet. Schwieriger wird schon das Schneiden von Stengelstücken. Die Gewebe sind in frischem Zustand meistens so wenig konsistent, daß durch das Einklemmen in den Objekthalter bereits ein Zerdrücken eintreten würde. Hier kommt uns der Alkohol mit seinen härtenden Eigenschaften gut zu statten, und die Vorbehandlung der Objekte mit Alkohol verursacht eine Härtung, die zum Schneiden genügt. Sollte der Schnitt dabei etwas gequetscht werden, so tut dies nichts, denn beim Übertragen in Wasser werden die Schnitte sich ausdehnen und ihre ursprüngliche Form wieder annehmen.

Sind die Objekte (Blattstiele, Blätter, Wurzeln, Stengeln usw.) aber so fein, daß ein Einspannen in den Objekthalter nicht möglich ist, dann spanne man zwischen Holundermark oder Kork ein. Die Wahl zwischen diesen beiden Unterstützungsmitteln richtet sich nach der Festigkeit des Objektes; Kork kommt nur für resistentere Objekte in Frage. Das Holundermark wird längs gespalten und das Objekt zwischen den beiden Schnittflächen in der gewünschten Richtung orientiert; Objekt und Holundermark werden zusammen im Objekthalter eingeklemmt und das Mark mit dem Objekt geschnitten. So lassen sich verhältnismäßig feine Schnitte erzielen.

Selbst stark schwammige Objekte, die keine Quetschung vertragen, können mit Holundermark geschnitten werden. Das Objekt wird dabei nicht auf die glatte Schnittfläche des Holundermarks gelegt, sondern in kleinen rinnenartigen Vertiefungen orientiert, die mit einem Glasstab je nach der Größe des Objektes in das weiche Mark eingedrückt werden. Beim Zusammenpressen wird keine Quetschung eintreten können, weil der Druck gleichmäßig von allen Seiten kommt.

Ganz kleine und harte Objekte (z. B. Samen) werden wieder in anderer Weise behandelt. Hier schreite man zur einfachen Paraffin - Einbettung. Eine Paraffinplatte wird so erwärmt, daß sie leicht plastisch wird; mit dem Skalpell stellt man einen Spalt im Paraffin her, legt den kleinen Samen hinein, preßt schnell zusammen und kühlt in Wasser ab. Aus der Platte wird ein kleiner Paraffinblock mit dem Objekt herausgeschnitten, auf ein Holzklötzchen mit Paraffin aufgeschmolzen und das Schneiden mit dem Mikrotom kann beginnen. Das Paraffin löst sich sofort von dem Schnitt ab und dieser wird nach der Uhrschälchenmethode weiter verarbeitet.

Die oben beschriebenen Methoden sind natürlich nur brauchbar für solche Objekte, deren Elemente im Schnitt zusammenhalten; tritt beim Schneiden Auflösung in einzelne Bestandteile ein, wie z. B. bei Blütenknospen, Laubknospen, Holz und Rinde, dann muß in einfachster Weise eingebettet werden, damit die einzelnen Teile in ihrer Lage bleiben. Gute Resultate erzielt man mit Glyzeringelatine. Kisser (1926) beschreibt folgende Lösung als sehr brauchbar: 7 g Gelatine läßt man in 42 ccm dest. Wasser 2 Stunden quellen, fügt 50 g reines Glyzerin und 1 g Karbolsäure hinzu, erwärmt 10—15 Minuten und filtriert heiß. Zum Übertragen der Objekte wird die Gelatine durch Erwärmen verflüssigt; wollen die Objekte nicht untersinken, so muß die Luft durch die Wasserstrahlluftpumpe aus dem Gewebe entfernt werden. Aus der er-

starten Gelatine schneidet man kleine Blöcke mit dem Objekt heraus und härtet sie zum Schneiden in 70%igem Alkohol oder in 40%igem Formol; feine Schnitte können nicht hergestellt werden.

13. Das Einbetten der Objekte zur Anfertigung von Mikrotomschnitten

Die Objekte sind, nachdem sie die in den vorhergehenden Abschnitten geschilderte Behandlung erfahren haben, noch nicht schnittfertig. Das Schneiden mit dem Mikrotom erfordert eine Umkleidung des Objekts mit einem Medium, das diesem erst die Schnittfähigkeit gibt. Aber nicht nur eine Umkleidung soll erreicht werden, sondern auch eine Durchdringung des Objekts bis in seine kleinsten und feinsten Lücken. Allgemein gebräuchlich sind die Einbettungen in Paraffin, Zelloidin und Glyzeringelatine.

Die Paraffinmethode ist die allgemein gebräuchlichste in der Botanik. Der Anwendungsbereich ist ziemlich groß und die Vorzüge vor den anderen Methoden überwiegen in einem solchen Maße, daß nur sie bei den feinsten botanischen Untersuchungen Anwendung findet. Das Paraffin dringt schnell, gut und vollständig in die Objekte ein, verändert die Zellstrukturen und ihre Inhalte in keiner Weise und läßt infolge seiner verschiedenen Härtegrade sich auch bei konsistenteren Objekten anwenden. Es gestattet eine Zerlegung der Objekte in lückenlose Schnittserien und erlaubt Schnittstärken bis zu 1 μ.

Die Anwendung der Zelloidin-Methode für pflanzliche Objekte ist recht beschränkt. Der Hauptvorteil dieser Methode ist wohl darin zu suchen, daß das Eindringen des Zelloidins in die Objekte bei normaler Temperatur erfolgt, ein Ofen sich also als überflüssig erweist. Es dringt sehr leicht ein, vermag aber infolge seiner Molekülgröße die Zellwände nicht zu durchdringen; es werden wesentlich die Interzellularräume erfüllt. Demgegenüber steht nun aber der Nachteil, daß nur dicke Schnitte angefertigt werden können und Schnittserien nur schwer zu erhalten sind. Die Schnitte müssen einzeln vom Mikrotommesser abgenommen und auf den Objektträger übertragen werden.

Eine Vereinigung der Zelloidin- und Paraffinmethode — Doppeleinbettung — liefert gute Ergebnisse beim Bearbeiten von grösserem und härterem Material, doch erfordert diese Doppeleinbettung eine verhältnismäßig lange Vorbereitung.

Die Glyzeringelatine-Methode hat wohl den kleinsten Anwendungsbereich. Wenn hier trotzdem darauf hingewiesen wird, so geschieht es aus dem Grunde, weil bei dieser Methode eine Entwässerung der Objekte nicht notwendig ist. Schwammige Objekte, die bei der Alkoholbehandlung so stark schrumpfen würden, daß die Ergebnisse der Untersuchung zweifelhaft blieben, können mit dieser Methode sicher bearbeitet werden. Die Schnittstärke wird aber immer über 10 μ liegen.

a) Die Paraffinmethode

Das in der mikroskopischen Technik gebrauchte Paraffin ist eine bei Zimmertemperatur feste Masse, die je nach der Sorte bei 40—60° C schmilzt. Die Wahl der Sorte hängt von der Außentemperatur, d. h. der Temperatur des Zimmers, in dem man arbeitet, sowie von der Konsistenz des Objekts ab. Im Sommer nimmt man gewöhnlich etwas hartes, schwerer schmelzbares Paraffin (55—58° C) und im Winter solches von 50—54° C. Für größere dicke Schnitte (von 0,04—0,02 mm) nimmt man weicheres (von 40—49° C), für kleinere dünnere Schnitte (von 10—2,5 μ) hartes Paraffin (50—58° C). Vorteilhaft ist es daher, stets hartes und weiches Paraffin vorrätig zu halten, aus dem man dann jederzeit die gewünschte Mittelsorte zusammenschmelzen kann.[1])

Die Übertragung der Objekte ins Paraffin kann nicht direkt vom Alkohol aus erfolgen, sondern es müssen einige Zwischenstufen eingeschaltet werden. Die anzuwendenden Flüssigkeiten müssen wasserfrei sein und sich mit Alkohol und Paraffin gleich gut mischen. Es gibt eine ganze Reihe solcher Flüssigkeiten (= Intermedien); hier seien nur Benzol, Xylol, Chloroform und einige Öle — Bergamottöl, Zedernholzöl — erwähnt.

Vollständige Entwässerung des Objekts ist die wichtigste Vorbedingung für das gute Gelingen der Einbettung. Nehmen wir an, daß unser einzubettendes Objekt bereits fixiert und durch die Alkoholreihe hindurchgeführt worden ist, dann gestaltet sich der Gang der Weiterverarbeitung folgendermaßen. Das Objekt wird aus dem 96%igen Alkohol herausgenommen und für 2 Stunden in frischen 96%igen oder absoluten Alkohol überführt. Schon vorher hat man sich bestimmte Mischungen vom Alkohol und Intermedium hergestellt, weil nämlich beim Über-

[1]) Zu verwerfen ist die Anwendung des gewöhnlichen Stearins unserer Kerzen zur Einbettung von Objekten, wie es leider immer noch vorkommt; denn Stearin ist sehr stark verunreinigt und mit anderen Stoffen vermengt, die das Objekt meistens beschädigen.

gang vom Alkohol ins Intermedium Diffusionsströme auftreten können, die feinere Objekte zu Schrumpfungen veranlassen und selbst Zerreißungen herbeiführen können. Man mischt absoluten Alkohol und Benzol in folgenden Verhältnissen:

1. 3 Teile Alkohol + 1 Teil Benzol.
2. 2 Teile Alkohol + 2 Teile Benzol.
3. 1 Teil Alkohol + 3 Teile Benzol.

Vom Objekt wird jetzt schnell der Alkohol abgegossen und durch die erste Lösung ersetzt. Die Einwirkungsdauer richtet sich nach der Größe des Objekts und muß von Fall zu Fall entschieden werden. Im allgemeinen genügt für kleine Objekte eine Einwirkungsdauer jeder Stufe von 30 Minuten; größere Objekte verbleiben in jeder Stufe 1—12 Stunden. Treten beim Ueberführen des Objekts vom Alkohol in die erste Stufe bereits weißliche Stellen im Objekt auf, dann ist dies ein Zeichen, daß die Entwässerung des Objekts nicht vollständig ist; man übertrage sofort in Alkohol zurück. Die Objekte werden in den einzelnen Stufen immer durchscheinender. Sind die drei Stufen durchlaufen, dann übertrage man in reines Benzol und wechsle dieses ein- bis zweimal, damit auch jede Spur vom Alkohol entfernt wird. — Zum Benzol setzt man jetzt Paraffinspäne hinzu, die sich bereits bei Zimmertemperatur lösen. Diese Paraffinlösung in Benzol überträgt man mit den Objekten in kleine Salznäpfchen, gießt $^2/_3$ der Lösung ab und füllt die Näpfchen bis zum Rande mit Paraffinspänen. Jetzt erst sind die Objekte fertig zum Einbringen in den Wärmeschrank, wo das Paraffin sich lösen und das Gewebe vollständig durchdringen kann.

Benzol hat vor dem Xylol den Vorteil, daß es bereits bei 80° siedet (Xylol bei 140°), also bedeutend leichter flüchtig ist. Bei der Anwendung von Xylol geht man denselben Weg wie beim Benzol.

Der Siedepunkt des Chloroforms liegt noch niedriger als der des Benzols (bei 61°) und es wird wegen seiner schonenden Einwirkung besonders bei feinen Objekten als Intermedium gerne angewandt. Die im Handel käufliche Ware ist meistens nicht wasser- und alkoholfrei; zur Reinigung läßt man es daher längere Zeit über Kalziumchlorid stehen und filtriert ab. Chloroform muß in braunen Flaschen aufbewahrt werden, da es sich am Lichte zersetzt. — Die Objekte werden vom absoluten Alkohol in ein Gemisch von Alkohol und Chloroform zu gleichen Teilen überführt. Da das Chloroform nur sehr schwer eindringt, schwimmen die Objekte meistens einige Zeit an der Oberfläche. Erst nachdem sie untergesunken sind, darf man sie in reines Chloroform übertragen und hier verbleiben sie wenigstens zwei Tage. Wollen die Objekte nicht untersinken, dann wird dem Chloroform ein wenig Äther zugesetzt (Kisser 1926 gibt an: auf 100 ccm Chloroform 1 ccm Äther), oder man wirft zwei erbsengroße Stücke Paraffin hinein und stellt das Glas für 2—3 Stunden auf den Wärmeschrank. Das Untersinken wird dann eintreten. Das reine Chloroform wird nun bis auf $^1/_3$ seines Volumens entfernt und durch Paraffinspäne ersetzt. Die Objekte sind fertig für den Wärmeschrank.

Die Anwendung des Zedernholzöles als Intermedium (eingedicktes Immersionsöl!) hat den Vorteil, daß die Objekte nur sehr kurze Zeit der Wärme ausgesetzt werden brauchen. Die Objekte werden vom absoluten Alkohol in folgende Stufen überführt:

1. 1 Teil abs. Alkohol + 1 Teil Zedernöl	2 Stunden
2. 1 Teil abs. Alkohol + 3 Teile Zedernöl	2 Stunden
3. Reines Zedernöl	24 Stunden
4. Reines Zedernöl	24 Stunden

Bei der 3. und 4. Stufe werden nur geringe Mengen des Öles gebraucht. Die Objekte können vom reinen Zedernöl aus direkt in flüssiges Paraffin von 52° Schmelzpunkt übertragen werden. Im Wärmeschrank wird das Paraffin noch einmal gewechselt und nach 24stündigem Verweilen im Wärmeschrank ist das Objekt fertig zum Einbetten. Das Zedernöl wird gern angewandt bei harten und brüchigen Objekten, weil durch das Eindringen des Öles eine bessere Schneidfähigkeit herbeigeführt wird. — Bergamottöl wird wie Zedernöl angewandt; nur die Stufen 1 und 2 der Mischung müssen je zwei Tage einwirken.

1. Das Durchtränken mit Paraffin und das Einbetten in Paraffin

Beim Durchtränken mit Paraffin muß nun erst das Intermedium wieder entfernt werden. Das Gläschen mit den zugefügten Paraffinspänen kommt nicht sofort in den Wärmeschrank, sondern man stellt es auf den Wärmeofen, um eine Verunreinigung der Luft im Wärmeschrank durch verdunstendes Benzol, Xylol oder Chloroform zu vermeiden. Das Paraffin wird jetzt schon zu schmelzen beginnen und langsam werden kleine Paraffinschnitzel weiter zugefügt, bis eine Sättigung eingetreten ist. Erst dann bringe man die Gläser in den Ofen und lasse nun weiter verdunsten. Die Zeit des Verweilens im Wärmeschrank wird sich nach der Größe der Objekte richten und kann 3—4 Tage betragen. Ein längeres Verweilen

ist besser als eine unvollständige Durchtränkung. Durch öfteres Umschütteln kann man die Verdunstung des Intermediums beschleunigen. „Ob das Intermedium verdampft ist, merkt man meist schon daran, daß im Wärmeschrank kein Geruch nach ihm mehr wahrzunehmen ist. Noch besser ist es, wenn man eine Nadel in der Flamme erhitzt und sie dann in das zu prüfende Paraffin eintaucht. Entweichen kleine Gasblasen, so ist das ein Zeichen, daß noch Spuren vom Lösungsmittel vorhanden sind." (Kisser, 1926.) Zur Vermeidung von Verwechslungen bezeichnet man die einzelnen Gläser durch beigefügte Zettelchen (Bleistiftschrift!), die auch später mit eingebettet werden können. Sind die Objekte sehr klein oder durchsichtig, so daß eine richtige Orientierung beim Einbetten schwer möglich ist, so färbt man sie zur besseren Sichtbarmachung im Stück vor. Das kann man dadurch erreichen, daß man dem letzten Alkohol vor dem Intermedium eine Spur von Eosin zusetzt oder das Paraffin mit Sudan III oder Scharlach R anfärbt und die Objekte kurz vor dem Einbetten in reines Paraffin überträgt.

Ist das Paraffin völlig in das Objekt eingedrungen und das Intermedium daraus ganz verdrängt, so kann man zur definitiven Einbettung schreiten, die dadurch beendigt wird, daß man das Paraffin durch Abkühlung erstarren läßt, was in einem Uhrschälchen, Metallrähmchen, Papierkästchen oder einer leeren Deckglasschachtel usw. erfolgen kann.

Ein einfaches Verfahren zum Einbetten, das aber nur für sehr kleine Objekte anzuwenden ist, besteht darin, daß man ein Uhrschälchen etwas erwärmt, oder es auf einem Uhrglasteller, einem viereckigen Holzbrettchen mit Ausschnitt in der Mitte (Abb. 8), direkt auf eine Wärmebank stellt. Innen wird das Uhrgläschen durch den mit etwas Glyzerin befeuchteten Finger mit einer gleichmäßigen Glyzerinschicht überzogen, die das Festhaften des Paraffins am Glas verhindert. In das so vorbereitete Schälchen gießt man bis beinahe zum Rande reines, flüssiges Hartparaffin, legt rasch das Objekt hinein, schiebt es mit einer erwärmten Nadel (eine kalte Nadel würde das Paraffin zum Gerinnen bringen) in die richtige Lage („orientiert" das Objekt) und bringt es dann rasch über möglichst kaltem Wasser zum Erstarren, wie es Abb. 9 zeigt. Hat sich das Paraffin mit einer dünnen Haut überzogen, deren Bildung man durch Blasen beschleunigen kann, so senkt man das Uhrschälchen rasch in das Wasser und läßt es hier einige Minuten liegen.[1]) Darauf drückt man das Paraffin mit dem Objekt vorsichtig aus dem Uhrglas heraus, falls es sich nicht schon von selbst beim Unter-

Abb. 9. Erstarrenlassen des in das Uhrschälchen eingegossenen Paraffins

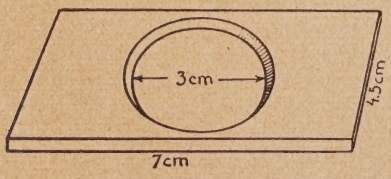


Abb. 8. Uhrglasteller

[1]) Es ist darauf zu achten, daß das Objekt erst dann in das Wasser versenkt wird, wenn die oberste Paraffinschicht so weit erhärtet ist, daß kein Wasser eindringen kann. Ist das Wasser eingedrungen, so entstehen Blasen und Löcher im Paraffin, die den Block zum Schneiden unbrauchbar machen. Der Block muß daher nötigenfalls nochmals in reines Paraffin übertragen werden. Das gleiche ist zu tun, wenn das gekühlte Paraffin milchig weiß bleibt und gleichzeitig weich und schmierig ist. Das ist ein Zeichen, daß das Lösungsmittel (Chloroform, Benzol) nicht vollständig aus dem Paraffin entfernt war.

tauchen des Glases unters Wasser losgelöst hat, schneidet mit einem leicht erwärmten Messer einen gleichmäßigen, rechteckigen Block heraus und bezeichnet ihn, indem man mit einer Nadel den Namen des Objekts oder ein Zeichen in das Paraffin einritzt. Einen solchen Paraffinblock kann man jahrelang aufbewahren, wenn er nicht sofort zum Schneiden gelangen soll, wozu er, wie wir noch sehen werden, besonders zugerichtet werden muß.

Zum Einbetten nimmt man häufig statt eines Uhrschälchens besondere Gießformen, Metall- oder Glasrähmchen (-winkel) oder Papierkästchen, durch die man rechtwinklig geformte Blöcke erhält, in denen das Objekt innerhalb der regelmäßigen Grenzflächen ziemlich genau und leicht bemerkbar „orientiert" werden kann. Diese käuflichen Einbettungsrähmchen oder -winkel (Abb. 10) bestehen aus zwei rechtwinklig abgebogenen und abgeschliffenen Messingblechen (*a*) oder aus zwei starken Metall- (*b*) oder Glaswinkeln. Legt man die Winkel aneinander, so bilden sie mit der als Unterlage dienenden Glas- oder Metallplatte ein offenes Kästchen, dessen Größe verändert werden kann. Platte und Innenfläche der Winkel werden hauchdünn mit Glyzerin bestrichen. Dann gießen wir in das Kästchen etwas flüssiges Paraffin. Sobald das Paraffin sich so weit abgekühlt hat, daß das Objekt nicht mehr darin zu Boden sinken würde (was schon nach wenigen Sekunden eintritt), bringt man das Objekt mit einem erwärmten Spatel in das Kästchen und gießt so viel Paraffin zu, bis es ganz davon umgeben ist. (Wenn das Paraffin dem orientierten Objekt nicht möglichst rasch zugesetzt wird, so entstehen leicht Bruchlinien zwischen dem zuerst und dem später eingegossenen Paraffin, die sich beim Schneiden äußerst unangenehm bemerkbar machen können.) Darauf senken

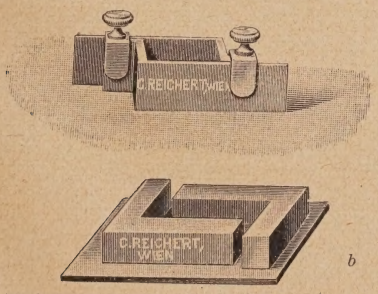


Abb. 10. Einbettungsrahmen für Paraffin. — *a* = aus starkem Messingblech; *b* = nach Prof. F. E. Schulze, aus zwei Glas- oder Metallwinkeln

wir das Kästchen mit der Grundplatte bis zu ¾ seiner Höhe schnell in eine größere Schale mit kaltem Wasser und blasen vorsichtig von oben auf das noch flüssige Paraffin. Hat sich dann auf seiner Oberfläche eine widerstandsfähige Haut gebildet, so

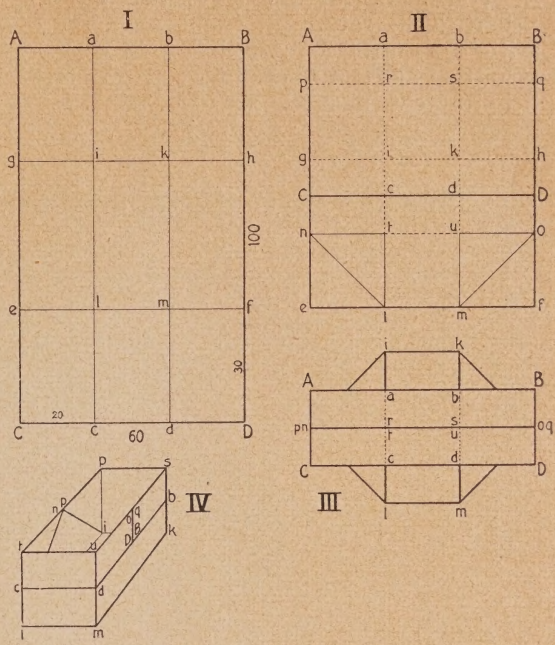


Abb. 11. Schema zur Anfertigung von Papierkästchen zur Paraffin- und Zelloidineinbettung

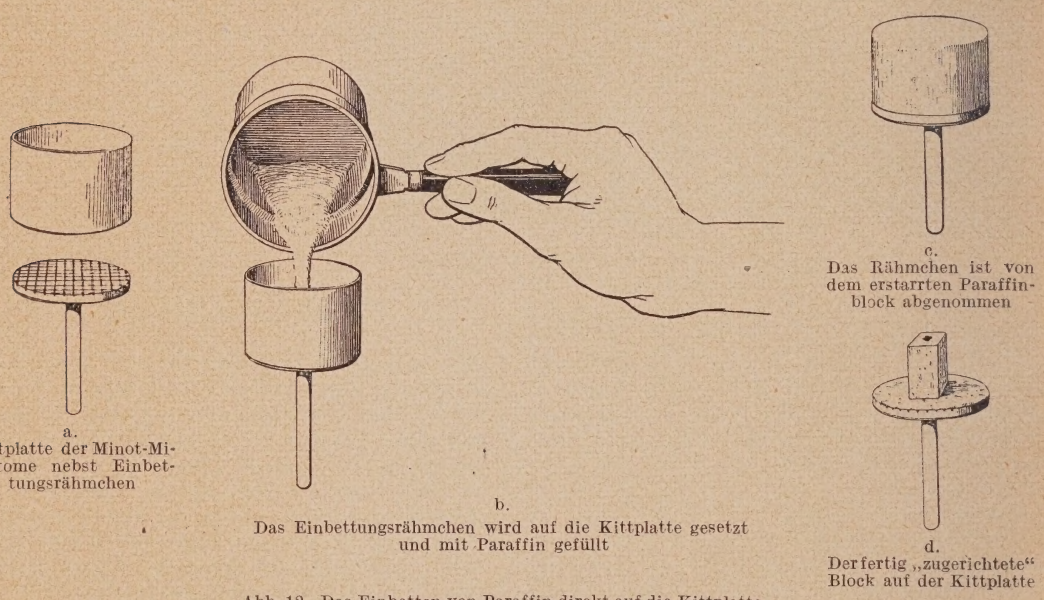
daß kein Wasser mehr in den Block eindringen kann, so lassen wir die Form rasch untersinken, aber gleichmäßig, daß sie sofort mit der ganzen Oberfläche unter den Wasserspiegel kommt. Nach ¼ bis ½ Stunde ist der Block in dem kalten Wasser völlig erstarrt und kann nun leicht aus dem Rähmchen entfernt werden, soll aber noch einige Zeit (¼ Stunde) im Wasser liegen bleiben. Das Einbettungsrähmchen ist sogleich zu reinigen.

Da das Paraffin sich beim Erstarren ziemlich stark zusammenzieht, so baucht sich der Block meist ein. Je schneller abgekühlt wird und das Paraffin erstarrt, um so ebener wird die Einbauchung auf der Oberseite sein. Nie darf die Einbauchung so weit hinabreichen, daß das Objekt an einer Stelle frei liegt. Sollten sich Höhlen, Blasen usw. im Block zeigen, so läßt sich manchmal abhelfen, wenn man eine heiße Nadel in die fehlerhafte Stelle einsticht, das Wasser mit Filtrierpapier daraus entfernt und mit einer Präpariernadel ein Stückchen festes Paraffin in die Lücke einschmilzt. Zeigen sich die Höhlen aber in nächster Nähe des Objekts, so bette man es lieber um, weil man sonst nie gute Schnitte bekommt. Zeigen sich erst während des Schneidens im Block Lücken, so füllt man

sie, so gut es eben geht, mit geschmolzenem Paraffin aus; dazu legt man einige Stückchen Paraffin auf einen Spatel, schmilzt sie und gießt die flüssige Masse auf die Schnittfläche; eventuell treibt man gleichzeitig die Luftblasen mit einer heißen Nadel behutsam aus den Lücken hervor. Der erste Schnitt geht dadurch meistens verloren.

Die billigste Vorrichtung zum Einbetten sind auf jeden Fall Papierkästchen, die man jederzeit in beliebiger Größe selbst herstellen kann. Man verwendet dazu am besten dünnen Postkarten-, Visitenkarten- oder Zeichenkarton und geht folgendermaßen vor (Abb. 11): Ein rechteckiges Kartonstück (100: 60 mm) *A B C D* (I) knickt man der Länge (*a c* und *b d*) und der Breite (*e f* und *g h*) zweimal nach oben um und wieder zurück, (d. h. auseinanderlegen) und kann dann nochmals verwendet werden. Etwa hängengebliebenes Papier muß man mit dem Messer von dem Block entfernen. Die weitere Bearbeitung des Blocks ist genau die gleiche wie die der mit Metallrähmchen hergestellten Blöcke.

Bei den Minot- oder Bandschnitt-Mikrotomen dienen als Objekttischchen sog. Kitt-platten (Abb. 12a—d), zu denen Einbettungsrähmchen geliefert werden. Das Objekt läßt sich damit direkt auf der Kittplatte selbst einbetten, was natürlich eine große Vereinfachung bedeutet. Allerdings ist dazu einige Übung erforderlich. Nachdem man das Rähmchen (*a*) auf die Kittplatte aufgesetzt hat, steckt man diese zur bequemen Handhabung in einen breiten Kork



a. Kittplatte der Minot-Mikrotome nebst Einbettungsrähmchen

b. Das Einbettungsrähmchen wird auf die Kittplatte gesetzt und mit Paraffin gefüllt

c. Das Rähmchen ist von dem erstarrten Paraffinblock abgenommen

d. Der fertig „zugerichtete" Block auf der Kittplatte

Abb. 12. Das Einbetten von Paraffin direkt auf die Kittplatte

so daß das hierdurch gebildete mittlere Rechteck *i k l m* die für das Objekt bestimmte Grundfläche des Kästchens bildet. Darauf schlägt man die Breitseiten (II) um *e f* und *g h* um, biegt das Dreieck *n e l* längs *n l* so um, daß *e* nach *t* zu liegen kommt, verfährt mit dem Dreieck *m f o* genau ebenso und schlägt zuletzt das Stück *C D n o* längs *n o* um (s. III). Dieselben Operationen werden auch am anderen Ende des Papieres ausgeführt. Schlägt man endlich die Falten *n o* und *p n* (die bei den benutzten Maßen zusammenfallen) in die Höhe und drückt die Ecken *l* und *m* bezw. *i* und *k* etwas ein, so ist das Kästchen fertig (s. IV). Hat man die Wände 20 mm hoch gewählt, so erhält man ein Kästchen von 20: 40 mm Grundfläche. Auch für Zelloidineinbettung sind diese Kästchen zu verwenden. Hat man dann sehr rasch in Wasser abgekühlt, so läßt sich das Kästchen meist bequem von dem erstarrten Block ablösen oder in sonst eine Unterlage (Zwirnfadenrolle) und gießt das Paraffin ein (*b*), das sich infolge der Riefen der Kittplatte sehr fest mit dieser verbindet. Ist das Objekt orientiert und das Rähmchen ganz mit Paraffin angefüllt, so wird es rasch in Wasser abgekühlt. Nach der Erstarrung des Paraffins wird das Rähmchen, das mit Glyzerin ausgestrichen war, abgenommen (*c*) und der Block mit dem erwärmten Messer in die gewünschte Form gebracht (zugerichtet) (*d*), wobei man die Kittplatte selbst mit Paraffin bedeckt läßt, damit der Block besser haftet. Die gleiche Vorrichtung eignet sich auch zum Einbetten in Zelloidin.

2. Paraffinschnittbänder

Die in Wasser abgekühlten Paraffinblöcke mit den darin enthaltenen Objekten sind

jetzt zum Schneiden fertig. Aus dem großen Stück — wenn mehrere Objekte in einem Block eingebettet sind — schneiden wir mit dem Messer ein Stückchen heraus, und zwar so, daß das Paraffin nur geritzt wird, es bricht an der geritzten Kante sehr leicht durch und eine Beschädigung des Objekts ist ausgeschlossen. Bei festem Schneiden würde das Paraffin vom Schnitt nach allen Seiten hin splittern und eine Zerreißung

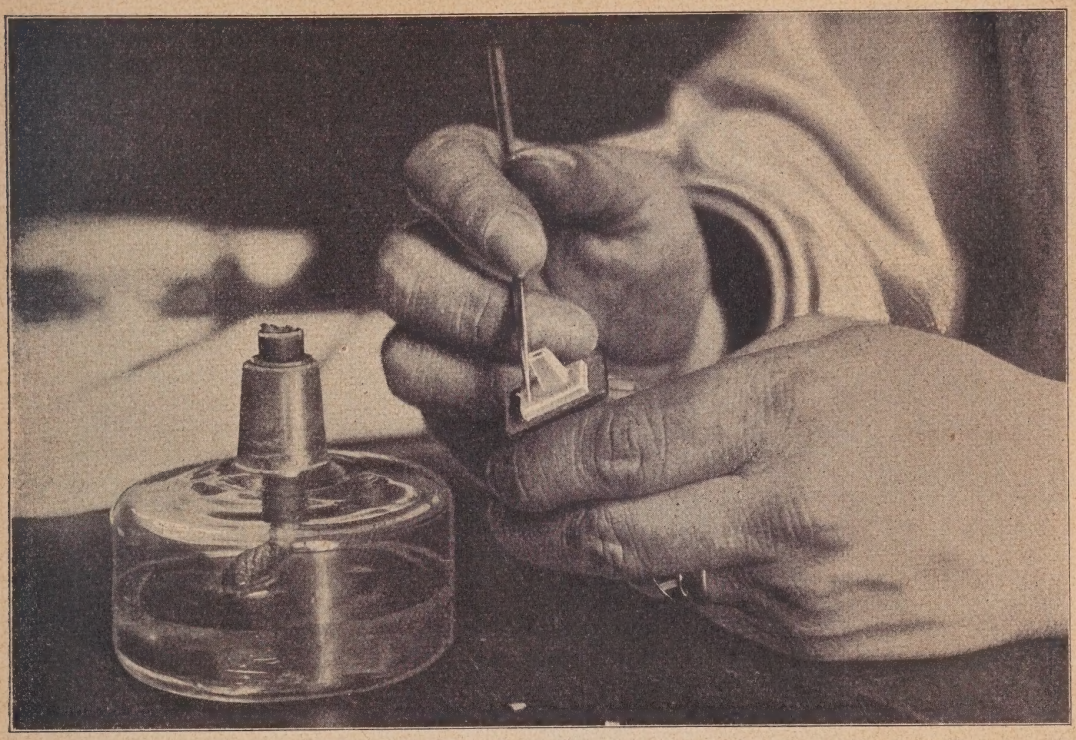


Abb. 13. Zuschneiden des Paraffinblocks vor dem Schneiden mit dem Mikrotom

des Objekts könnte die Folge sein. Das Objekt muß im Rohschnitt allseits ½ cm dick mit Paraffin umgeben sein, weil das endgültige Zuschneiden erst später erfolgen kann. Schon vorher hat man sich kleine prismatische Holzblöckchen zugerichtet, die der Aufnahme des Objekts dienen sollen. Die Holzklötzchen werden im oberen Teil durchbohrt und mit einer Bleifüllung versehen, eine Vorsorge, die sich später beim Abkühlen des aufgeklebten „aufgeblockten" Objekts angenehm bemerkbar macht. Soll der Holzklotz zum ersten Male zum Aufblocken benutzt werden, dann taucht man ihn vorher für einige Augenblicke mit der Oberkante in flüssiges Paraffin ein und kühlt in Wasser ab. Nun verflüssigen wir mit einem heiß gemachten Spatel die obere Paraffinlage des Blocks und gleichzeitig die Unterlage des Objektblocks und drücken beide mit sanftem Druck gegeneinander. Der Paraffinblock ist jetzt mit dem Klötzchen fest verbunden. Mit dem Spatel werden auch die Seitenflächen des Paraffinblocks kurz erhitzt und das abfließende Paraffin legt sich wie ein Wall fest um die Unterkante. Das aufgeblockte Objekt wird zum Abkühlen ins Wasser getaucht; infolge der Bleieinlage steht das Objekt auf dem Kopf und wird allseits von Wasser umgeben.

Erst nach dem Abkühlen kann der Paraffinblock endgültig zugeschnitten, „zugerichtet" werden, aber nicht mit einem starken, kalten Messer, weil das Paraffin dabei brechen und abspringen würde. Wir erwärmen vielmehr ein scharfes dünnes Skalpell in der Spiritusflamme und schneiden damit schichtweise Stückchen von ½—1 mm Dicke ab; das Messer ist beim Schneiden stets mit der Schneide vom Objekt weg gerichtet, wie Abb. 13 zeigt. Mit dem Zuschneiden gehen wir so weit, daß auf jeder Seite des Objekts nur noch eine etwa 1 mm dicke Paraffinschicht vorhanden ist. Nach der Grundfläche zu läßt man jedoch mehr Paraffin stehen, damit der Block die für das Schneiden nötige Festigkeit behält.

Der fertig zugeschnittene Block soll die Form eines nach unten zu breiter werdenden, oben scharf rechteckig begrenzten vierkantigen Prismas haben, dessen Grundfläche gut 5—6 mm vom Objekt abliegen darf, während oben nur 1—2 mm Paraffin das Objekt bedecken. Die Gesamthöhe des Prismas soll nicht mehr als 1—1½ cm betragen. Ein breiterer Paraffinrand als angegeben, nimmt nur unnötig Raum auf dem Objektträger fort, so daß nur wenige Schnitte darauf Platz haben. Dadurch wird der Verbrauch von Objektträgern und Deckgläsern unnötig gesteigert. Nach beendetem

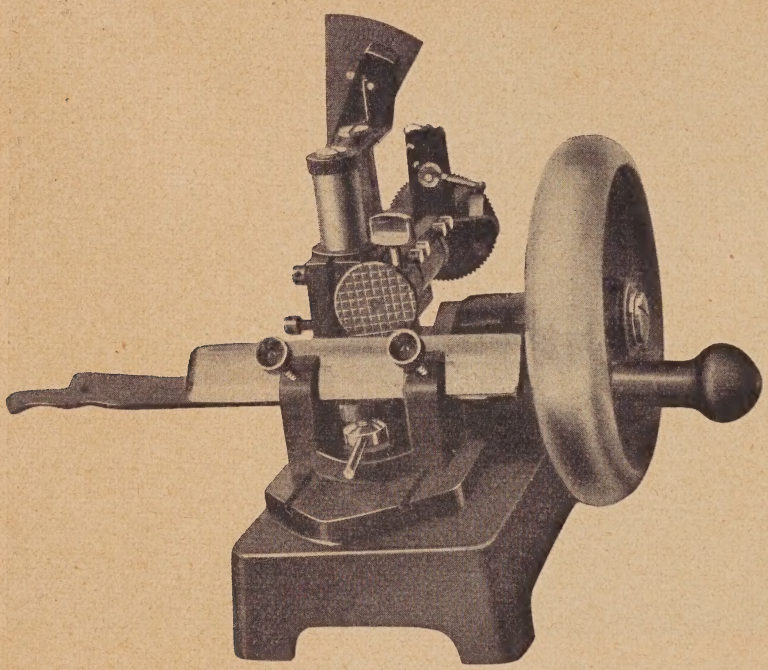


Abb. 14. Das neue Kosmos-Mikrotom

Zuschneiden schrauben wir das Paraffintischschen am Mikrotom fest und stellen es nahezu in Höhe der Messerschneide ein.

Das Objekt wird vor dem Schneiden zum Mikrotommesser in die richtige Stellung gebracht. Im allgemeinen wird mit quergestelltem Messer geschnitten, d. h. das Messer steht so zum Objekt, daß zwei Objektkanten parallel der Messerschneide laufen. Bei großen Objekten, die eine verschiedene Kantenlänge des Paraffinblocks hervorrufen, stellt man die schmale Kante parallel zum Messer. Der Widerstand ist dann bedeutend verringert und es besteht nicht so leicht die Gefahr, daß der Block durch die mechanische Beanspruchung durch das aufprallende Messer an seiner Grundfläche gelöst wird. Kleinere Objekte schneide man lieber mit der Breitseite quer zum Messer, da die Schnitte dann besser aneinanderhaften.

Handelt es sich um Objekte, die sich wegen ihrer Größe oder Härte nicht mit quergestelltem Messer schneiden lassen, so stellt man das Messer schräg ein, daß seine Schneide mit der Schnittrichtung einen Winkel von 40—45 Grad bildet und orientiert den dreiseitig prismatisch zugeschnittenen Block so, daß das Messer zuerst eine Kante trifft. Dabei ist das Messer unter Vermeidung jeden Druckes langsam zu bewegen, durch das Objekt zu „ziehen". Jeder Schnitt wird einzeln mit einem Pinsel von der Klinge abgehoben.

Abgesehen von diesem letzt geschilderten Spezialfall, wo mit schräg gestelltem Messer geschnitten wird, muß das Schneiden des Objekts sonst so verlaufen, daß ein Paraffinband entsteht. Schon bei den ersten Schnitten wird sich zeigen, ob der Block richtig zugeschnitten ist. Ergibt sich ein krumm verlaufendes Schnittband, dann sind die Kanten nicht parallel zugeschnitten und durch eine Korrektur ist dieser Schaden zu beheben. Anfangs trägt man Schnitte bis zu einer Stärke von 30—40 μ ab, kontrolliert mit einer Lupe die Lage des Objekts und beginnt mit dem vorgeschriebenen feinen Schnitt dann, wenn man sich dem Objekt genügend genähert hat. Die Schnitte bleiben bei ruhigem und gleichmäßigem Schneiden mit den Kanten aneinander haften und bilden so ein Band, das über die Messerfläche dahingleitet. Durch das Aufprallen des Messers wird nämlich Wärme erzeugt, und die einzelnen Schnitte, an der einen Schnittkante erwärmt und erweicht, kleben fest aneinander. Vorbedingung für das Erhalten eines Schnittbandes ist aber ein rasches Schneiden.

Das Band wird bei gutem Zusammenhalten bald so lang werden, daß es über den Messerrücken hinübergleitet und herabhängt. Das Stützen des Bandes kann nun so geschehen, daß man es mit einer feinen Präpariernadel oder mit einem Pinsel hoch hält und dann weiterschneidet. Meistens

ist aber die linke Hand am Mikrometer des Mikrotoms betätigt und so bleibt nun keine Hand zur Führung des Schnittbandes frei;

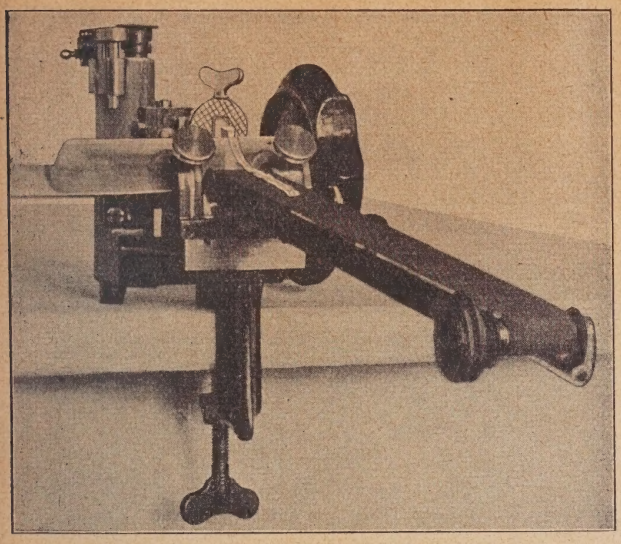


Abb. 15. Die Bandführung am alten Kosmos-Mikrotom im Gebrauch

das Band muß, wenn es Messerbreite erreicht hat, auf einen feinen sauberen schwarzen Karton übertragen werden. Der Vorteil eines Mikrotoms mit automatischer Schnitteinstellung tritt hier ganz klar hervor; die linke Hand ist frei und kann sich bei der Führung des Schnittbandes betätigen. An dem neuen Kosmos-Mikrotom (Abb. 14), das nach den gleichen Grundsätzen wie die großen Minot- oder Bandschnitt-Mikrotome gebaut ist, kann eine Minotsche Mikrotom-Bandführung angebracht werden (Abb. 15), die als endloses Band dauernd die Schnitte weitertransportiert.

Kommen die Schnittbänder nicht sofort zur Bearbeitung, so legt man sie auf Fließpapier, Glas oder schwarzen Karton und bedeckt sie staubsicher mit einer Glasglocke. So können die Schnitte ganz gut einige Stunden liegen, bis man den ganzen Block fertig geschnitten hat und nun zur weiteren Verarbeitung übergehen kann. Man beachtet dabei, daß die Oberseite der Schnitte matt, die Unterseite glänzend ist und lege immer die matte Seite nach oben. Da die Schnittbänder meistens zu lang sind, um unter einem Deckglas Platz zu finden, so trennt man die entsprechende Anzahl Schnitte mit einem scharfen Skalpell von dem Band ab.

Auf das Abnehmen des Schnittbandes vom Messer muß noch kurz hingewiesen werden. Hat das Band die nötige Länge erreicht, dann löse man nicht an der Schneide des Messers ab, sondern trenne die Schnitte an der Haftstelle auf dem Messer voneinander, so daß noch einige Schnitte zurückbleiben. Müssen alle Schnitte entfernt werden, so unterfährt man den letzten Schnitt ganz vorsichtig mit einem Pinsel oder einer Nadel und löst ihn ab ohne die Messerschneide zu berühren. Gerade durch unvorsichtiges Ablösen der Schnitte kann die Messerschneide beschädigt und damit für weitere Schnitte unbrauchbar gemacht werden.

Über die Stärke der Schnitte muß bei den einzelnen Objekten gesprochen werden, doch kann hier schon gesagt werden, daß eine Schnittstärke von 10—15 μ für kleine Objekte der Durchschnitt ist; bei großzelligen Geweben geht man bis auf 30—70 μ.

3. Schwierigkeiten beim Schneiden

Das Rollen der Schnitte beim Schneiden ist eine recht häufige Erscheinung. Sie ist zumeist auf ungünstige Zimmertemperatur oder auf die falsche Wahl der Schnittstärke zurückzuführen. Durch leichtes Erwärmen des Blocks in Wasser oder durch Anhauchen kann diesem Übelstand abgeholfen werden. Das Einrollen der Schnitte läßt sich bei einiger Übung auch ganz gut mit einem Pinsel verhindern. Sowie das Messer den Schnitt gefaßt hat, legt man mit der linken Hand den Pinsel schräg an den sich aufrichtenden Schnitt an und drückt ihn sanft auf das Messer nieder. Wer diese kleine Mühe scheut, und Schaden befürchtet, kann auch einen Schnittstrecker benutzen, dessen Wirkung auf die Schnitte sich aus Abb. 16 leicht erklärt.

Das Wellen der Schnitte ist an sich bedeutungslos, doch kann die Zusammen-

Abb. 16. Schnittstrecker nach Mayer

pressung der Schnitte in der Schnittrichtung eine Verzerrung des Objekts zur Folge haben. Ist die Wellung nicht sehr stark, dann wird sie beim Strecken der Schnitte wieder zurückgehen.

Wollen die Schnitte nicht aneinander haften, so kann man den ganzen Block schnell in eine Paraffinlösung vom Schmelzpunkt 40° eintauchen und einen Mantel von weichem Paraffin herumlegen. Nach dem Erstarren wird der Block so zurechtgeschnitten, daß das weiche Paraffin nur an den dem Messer parallelen Kanten stehen bleibt; das weichere Paraffin wird leicht haften.

Werden die Schnitte beim Zurückgehen des Messers vom Paraffinblock abgestreift, so ist das ein Zeichen für die Unbrauchbarkeit des Messers. Die Sägung ist zu grob, das Messer muß nachgeschliffen werden.

Die Kennzeichnung der Schnittrichtung durch weiße Streifen auf der Oberfläche des Paraffinblocks ist ein Zeichen für mikroskopische Scharten im Messer; das Paraffin wird nicht geschnitten, sondern geschabt. Ähnliche Erscheinungen treten auf, wenn das Paraffin durch feste Teilchen verunreinigt ist oder wenn sich harte Teile vom Objekt ablösen und beim Schneiden über die Fläche mitgerissen werden. Werden die Streifen durch das Objekt verursacht, so muß dieses herausgelöst und einer entsprechenden Nachbehandlung unterzogen werden. Messerunebenheiten werden durch Schleifen beseitigt.

Die Krümmung der Schnittbänder ist bedingt durch ein ungenaues Zuschneiden des Paraffinblocks. Sie kann durch eine Schnittkorrektur beseitigt werden. Bleibt die Krümmung nach der Korrektur bestehen, so ist vielleicht die Lage des Objekts im Paraffinblock (nicht in der Mitte) die Veranlassung oder aber die Messerschneide zeigt keine gleichmäßige Schärfe.

Bei zu hartem Paraffin bröckeln die Schnitte. Man kann nur dadurch Abhilfe schaffen, daß man in der Nähe eines Ofens arbeitet oder bei Gasbeleuchtung die Lampe ziemlich nahe an das Mikrotom stellt. Oft führt auch schon ein leichtes Erwärmen des Messers zum Ziel, denn selbst gutes Paraffin bröckelt, wenn es mit kaltem Messer geschnitten wird. Macht sich der Schaden während des Schneidens bemerkbar, so zögere man nicht, den Block entsprechend zu drehen. Auf diese Weise ist es oft möglich, auch ein widerspenstiges Präparat noch gut auszunützen.

Schneidet sich das Paraffin schmierig, dann ist sofort umzubetten, weil noch Reste vom Intermedium (Benzol oder Xylol) vorhanden sind.

Bei raschem Schneiden können die Schnittbänder elektrisch werden. Sie legen sich dann innig den Metallteilen des Mikrotoms an. Häufig können die Schnitte gar nicht oder nur unter Gefahr einer Zerreißung abgenommen werden. Das Nähern einer Flamme oder das Anhauchen der Bänder schafft meistens schon Abhilfe. In ganz schwierigen Fällen muß die Luft mit Hilfe eines Funkeninduktors ionisiert werden.

Abb. 17. Aufkleben der Paraffinschnitte auf den Objektträger

4. Das Aufkleben der Schnitte

Zur Weiterverarbeitung müssen die Schnitte auf den Objektträger aufgeklebt werden, da sie einer Einzelbehandlung nicht zugänglich sind. Die Objektträger müssen vorher gut gereinigt werden, und es wird hier nochmals auf die auf S. 2 beschriebene Reinigungsmethode hingewiesen. Nehmen wir an, die Schnitte befänden sich vom Schneiden her noch auf dem schwarzen Karton und sollen nun übertragen werden. Nach der Größe des Deckglases wird sich die Zahl der Schnitte richten, die man auf einem Objektträger unterbringen kann, und um nicht eine Überladung des Objektträgers vorzunehmen, zeichnet man sich auf einem weißen Karton ein schwarzes Feld in Größe des Deckglases auf und legt den Objektträger darauf; durch das Glas hindurch überschaut man ganz deutlich den Bereich, den man mit Schnitten belegen darf. Die Schnitte dürfen nicht wahllos aufgelegt werden, sondern es ist mit größter Sorgfalt die Reihenfolge innezuhalten, die die Schnittserie ergeben hat. Die Schnitte werden nicht zur Mitte des Objektträgers, sondern etwas einseitig orientiert, weil dadurch eine Flüssigkeitsersparnis bei der weiteren Verarbeitung erzielt wird (Abb. 17). Die Übertragung der Schnitte geschieht mit einem feinen Pinsel. Zur Vermeidung von Verwechslungen und Innehaltung der Schnittserien bezeichnet man die Objektträger mit einem Schreibdiamanten oder einem Fettstift.

Die einfachste Aufklebemethode ist das Aufkleben mit destilliertem Wasser auf den peinlichst gereinigten Objektträger. Das Haften der Schnitte erfolgt dabei durch Kapillaradhäsion, doch versagt diese Methode bei pflanzlichen Objekten meistens, weil die Spannungen im Gewebe, die durch die verschiedenen Behandlungsflüssigkeiten hervorgerufen werden, eine Ablösung vom Objektträger bewirken. Man legt die Objekte so auf den Objektträger, daß die dem Messer zugekehrte glänzende Fläche des Schnittes auf das Glas zu liegen kommt. Die Schnitte schwimmen jetzt auf dem Wasser und werden über einer Spiritusflamme gestreckt; das überschüssige Wasser wird mit Fließpapier abgesaugt. Notwendig wird diese recht unsichere Methode bei feinen Plasmauntersuchungen, wo der Zusatz des Aufklebemittels eine Veränderung hervorrufen könnte.

Die sichersten Ergebnisse liefert immer das Aufkleben mit Eiweißglyzerin und Wasser. Man nimmt das Eiweiß von einem frischen Hühnerei und setzt die gleiche Menge chemisch reines Glyzerin hinzu. Das Gemisch wird gut durchgeschüttelt, filtriert (kann mehrere Tage dauern) und um Fäulnis und Schimmelbildung zu vermeiden, gibt man ein erbsengroßes Stückchen Kampfer hinzu. Das Filtrat wird in kleine Stiftfläschchen abgefüllt und gut verschlossen aufbewahrt.[1]) Auf einen gut gereinigten Objektträger wird ein kleines Tröpfchen Eiweißglyzerin übertragen und mit dem sauberen Finger möglichst dünn verrieben; die Schicht darf nur wie ein Hauch auf dem Objektträger liegen. Bevor die Schnitte aufgelegt werden, bringt man mit einer Pipette reichlich destilliertes Wasser auf den mit Eiweißglyzerin präparierten Objektträger und läßt die Schnitte auf dem Wasser schwimmen. Ist der Objektträger mit Schnitten beschickt, dann befördert man das Strecken der Schnitte durch Erwärmen. Der Objektträger wird durch die Spiritusflamme gezogen und die Unebenheiten der Schnitte verschwinden. Das Paraffin darf dabei nicht schmelzen! Das überschüssige Wasser läßt man ablaufen oder saugt es mit Fließpapier ab. Sollten sich die Schnitte beim Strecken verschoben haben, so kann man sie mit dem Pinsel wieder orientieren und dann läßt man die Schnitte an einem staubfreien und warmen Ort trocknen (Wärmeschrank). Das Strecken und Trocknen der Schnitte kann auch auf einer Wärmebank erfolgen. Die Schnitte haften nach dem Trocknen (24 Stunden) so fest am Objektträger, daß sie allen weiteren Manipulationen unterzogen werden können, ohne daß sie abfallen und wegschwimmen.

Werden die Schnitte im weiteren Verlauf der Verarbeitung mit starken Säuren oder Alkalien behandelt, so muß besondere Vorsorge getragen werden, da sie das Eiweiß lösen und ein Wegschwimmen der Schnitte wäre die Folge. Die ganzen Schnitte müssen mit einem dünnen Zelloidinhäutchen überkleidet werden. Aus den mit Eiweißglyzerin aufgeklebten Schnitten wird das Paraffin durch Xylol herausgelöst und der Objektträger wird in absoluten Alkohol und von da in eine 0,5 %ige Lösung von Zelloidin übertragen. Diese Lösung stellt man sich her aus Zelloidin und gleichen Teilen von absolutem Alkohol und Äther. Die Objektträger bleiben 5 Minuten in der Lösung und dann muß der Äther langsam an der Luft verdunsten. Ein ganz feines Häutchen von Zelloidin überzieht jetzt den Objektträger und zur Härtung des Häutchens überträgt man noch in 70 %igen Alkohol. Die Schnitte

[1]) Diese Mischung ist auch als Albuminglyzerin nach Mayer gebrauchsfertig käuflich.

werden jetzt in gewöhnlicher Weise weiter behandelt.

Auch das Aufkleben der Schnitte mit Gelatine ist sehr sicher. Sie wird besonders zum Aufkleben von Zelloidinschnitten bevorzugt. Auf dem Wasserbade werden 10 g feine Gelatine in 100 ccm destilliertem Wasser gelöst; dann fügt man zur Klärung das Weiße eines Hühnereis hinzu und läßt die Lösung unter ständigem Umrühren etwa 10 Minuten kochen. Nachdem heiß filtriert worden ist, setzt man 10 ccm einer 5 %igen wässrigen Karbolsäurelösung hinzu. Die Masse erstarrt beim Erkalten und muß in staubsicheren Flaschen aufbewahrt werden. Zum Aufkleben kann man linsengroße Stückchen auf den Objektträger bringen oder 10 g der Gelatine in 100 ccm destilliertem Wasser unter schwachem Erwärmen lösen. Die Flüssigkeit wird auf dem Objektträger als feines Häutchen verteilt, die Schnitte darauf gelegt, gestreckt und das überschüssige Wasser abgesogen. Zum Härten der Gelatine legt man die Objektträger unter eine gut schließende Glasglocke und setzt ein Schälchen mit Formol (40 %ig) hinein. Schon die Formoldämpfe härten die Gelatine, doch um sicher zu gehen, werden die Objektträger noch für einige Minuten in eine 10 %ige wässerige Formollösung eingestellt; abgetrocknet wird mit Fließpapier. Die Schnitte können auch bei der Behandlung mit scharfen Reagenzien nicht abschwimmen, weil die Gelatine sehr gut klebt. Die Weiterbehandlung erfolgt genau so wie bei Paraffinschnitten.

5. Die Befreiung der Schnitte vom Paraffin

Nachdem die Schnitte in der vorher beschriebenen Weise auf dem Objektträger aufgeklebt worden sind, kann man jetzt dazu übergehen, das Paraffin wieder daraus zu entfernen. Dazu bedient man sich besonderer Gläser, die mit den Lösungsmitteln (Xylol oder Benzol) gefüllt sind und in die die Objektträger eingestellt werden. Verschiedene Formen sind hier im Gebrauch und allgemein üblich. Will man nur wenige Objektträger zur Zeit verarbeiten, dann nimmt man einfache Zylindergläser (Höhe 10,5 cm, Innendurchmesser 5 cm) mit Überfalldeckel. In diesen Gläsern können immer vier Objektträger zur Zeit Platz finden. Zwei Objektträger werden mit dem Rücken gegeneinander gelegt und in die Flüssigkeit gebracht; ein zweites Paar wird so eingestellt, daß sich die Ränder der Objektträger am Boden des Gefäßes berühren und mit ihrer Oberkante der Wand des Zylinderglases anliegen. Um eine Berührung der Objektträgerpaare zu vermeiden, läßt man ein kleines Stückchen sauberen Kork dazwischen schwimmen. Beim Herausnehmen ist Vorsicht geboten, weil das Korkstückchen die Objekte vom Objektträger abstreifen könnte. Besser als diese Gläser sind große Glaströge, Küvetten, die mit Rillen zur Aufnahme der Objektträger versehen sind und in die man 16—20 Objektträger auf einmal einbringen kann. Die Objektträger werden auch hier wieder paarweise zusammengefaßt und in die Fugen eingestellt. Die Form der Gläser ist nicht ganz gleichgültig. Die flachliegenden Küvetten kosten große Flüssigkeitsmengen, da die Objektträger ganz eintauchen müssen und sie lassen kein sauberes Arbeiten zu (Pinzetten werden verunreinigt). Bedeutend besser sind hochstehende Formen. Die Flüssigkeit wird nur bis zu der Höhe hineingegossen, daß die Schnitte gut bedeckt sind und ein Teil des Objektträgers frei davon bleibt. Bei der weiteren Verarbeitung werden die Pinzetten nicht verunreinigt und die mit dem Fettstift aufgetragene Bezeichnung kann nicht leiden.

Zur Entfernung des Paraffins und zur Überführung der Schnitte bis zum Wasser stellt man sich folgende Flüssigkeitsreihe her: Xylol I, Xylol II, Alkohol und Xylol zu gleichen Teilen, 96-, 85-, 70- und 50 %igen Alkohol, destilliertes Wasser.

Die Objektträger werden zuerst in Xylol I so lange eingestellt, bis das Paraffin gelöst ist und dann in Xylol II übertragen. In den Gläsern selbst dürfen die Objektträger paarweise stehen, doch müssen sie einzeln übertragen werden, damit zwischen den Rückenflächen keine Flüssigkeitsmengen mit verschleppt werden; Trübungen wären die Folge. In 2—3 Minuten wird das Paraffin gelöst sein. Die einzelnen Alkoholstufen sind nacheinander so zur Einwirkung zu bringen, daß die Flüssigkeiten immer glatt ablaufen, sich keine Schlieren mehr bilden. Meistens wird dies nach 2 Minuten der Fall sein.

Die Entfernung des Paraffins aus den Schnitten macht eine Erkennung von Ober- und Unterseite der Objektträger manchmal schwierig, weil nämlich die Objekte sehr durchsichtig werden. Man gewöhne es sich an, immer die Fläche mit den Schnitten nach einer bestimmten Richtung in die Gläser zu stellen, damit die Übertragung ganz mechanisch erfolgen kann. Sieht man die Objektträger seitlich an, dann wird man bald einige Übung im Unterscheiden von Ober- und Unterseite erlangen.

Die Objektträger befinden sich jetzt in destilliertem Wasser und sind fertig zum Färben. Sollte sich im Wasser ein weiß-

licher Niederschlag in den Schnitten bilden, so ist noch Paraffin vorhanden und die Objektträger müssen denselben Weg rückwärts bis zum Xylol nehmen und hier so lange verbleiben, bis das Paraffin gelöst ist. Die Methoden zur Färbung der Schnitte sind auf S. 32 eingehend beschrieben.

Die Fixierung mit Osmiumsäure und osmiumsäurehaltigen Gemischen ruft Schwärzung der Gewebe hervor, die vor dem Färben entfernt werden muß. Aus dem destillierten Wasser werden die Objektträger in eine 3%ige Wasserstoffsuperoxyd-Lösung übertragen. Sie verbleiben darin so lange, bis die Schwärzung entfernt ist. Die Einwirkungszeit wird durch Beobachtung unter dem Mikroskop festgestellt; sie kann bis zu 12 Stunden betragen. Auch die Einwirkung von freiem Chlor bleicht die Objekte. Zu 100 ccm 70%igem Alkohol fügt man 2 g Kaliumchlorat und 2 Tropfen konzentrierte Salzsäure. In der Lösung entwickelt sich freies Chlor und die Einwirkung auf die eingestellten Schnitte ist so energisch, daß häufig schon nach ganz kurzer Zeit die Schwärzung entfernt ist.

6. Arbeitstabelle für die Paraffinmethode:

Die Objekte befinden sich in 96%igem Alkohol
↓
abs. Alkohol (2 Stunden)
↓
Intermedien

A		oder **B**	oder **C**	oder **D**
Alkohol + Benzol (3:1) Alkohol + Benzol (2:2) Alkohol + Benzol (1:3)	je nach der Größe des Objektes 30 Min. — 12 Std.	Xylol-Alkohol Mischung und Einwirkungsdauer wie bei A ↓ reines Xylol (einmal wechseln)	Chloroform + Alkohol (1:1) Objekte bis zum Untersinken in der Lösung belassen. — Dann Chloroform (2 Tage) ↓ reines Chloroform (2 Tage)	Zedernholzöl + Alkohol (1:1) 2 Stunden Zedernholzöl + Alkohol (3:1) 2 Stunden Zedernholzöl I rein 1 Tag Zedernholzöl II rein 1 Tg. ↓ direkt in flüssiges Paraffin (Schmelzpunkt 52°) übertragen
↓				
reines Benzol (einmal wechseln)				

↓

Lösungen bis auf 1/3 des Volumens einengen und Paraffinspäne hinzugeben. Auf den Wärmeschrank stellen. — Beim Schmelzen des Paraffins weitere Späne

↓

Dann 3—4 Tage in den Wärmeschrank stellen (Vor dem Einbetten das Paraffin wechseln!)

↓

Einbetten der Objekte in Paraffin und Abkühlen in Wasser.

↓

Aufblocken und Zuschneiden des Objekts. Schneiden mit dem Mikrotom

↓

Schnittbänder aufkleben mit
a) dest. Wasser oder
b) Eiweißglyzerin oder
c) Gelatine

↓

Strecken der Schnitte und trocknen

↓

Befreiung der Schnitte vom Paraffin. Nacheinander in 3 Minuten Abstand folgende Lösungen einwirken lassen:
Xylol I
Xylol II
Xylol + Alkohol zu gleichen Teilen
96-, 85-, 70- u. 50%igen Alkohol
dest. Wasser

↓

Bei Schwärzung der Objekte bleichen mit
a) Wasserstoffsuperoxyd oder
b) Chlor und Zurücküberführen in Wasser

↓

Die Schnitte sind fertig zur Färbung (vgl. S. 32).

b) Die Zelloidinmethode

Die Zelloidinmethode wird angewandt bei großen Objekten, die keine zu dünnen Schnitte erfordern. Auch das Schneiden von hartem und sprödem Material wird gerne in Zelloidin versucht.

Das in Form von Tafeln käufliche Zelloidin wird in kleine Würfel oder Späne geschnitten, die bei Zimmertemperatur an einem staubfreien Ort trocknen müssen; die Späne sehen gelblich aus und haben nach dem Trocknen hornartige Konsistenz. Zum Einbringen der Objekte stellt man sich eine 2-, 4- und 8%ige Lösung von Zelloidin in gleichen Teilen von Alkohol und Äther her. Bei der Herstellung dieser Durchtränkungslösungen muß peinlichst genau verfahren werden; besonders ist darauf zu achten, daß Alkohol und Äther vollkommen wasserfrei sind. Beim Alkohol stellt man etwaigen Wassergehalt durch Einwerfen eines Körnchens Kalziumkarbid fest; macht sich ein Geruch nach Azetylen bemerkbar, dann ist der Alkohol n i c h t wasserfrei und muß mit Kupfersulfat entwässert werden. Die Probe beim Äther nimmt man so vor, daß man gleiche Teile von Schwefelkohlenstoff und Äther schüttelt; die Trübung zeigt die Anwesenheit von Wasser an. Der Äther muß mit metallischem Natrium entwässert werden.

Die Lösungen werden in gut schließenden weithalsigen Flaschen angesetzt und aufbewahrt. Das Zelloidin löst sich nur recht langsam; durch Umkehren der Flaschen wird der Lösungsvorgang beschleunigt. Die 2%ige Lösung läßt sich in etwa 24 Stunden, die 4%ige in 2 Tagen und die 8%ige innerhalb von 3 Tagen herstellen.

Ist das Zelloidin vollständig gelöst, sind die Lösungen klar und nicht milchig getrübt, so kann mit dem Übertragen der Objekte begonnen werden. Vom 96%igen Alkohol kommen die Objekte zuerst für 2 Stunden in absoluten Alkohol und dann in ein Gemisch von Alkohol und Äther zu gleichen Teilen (12 Stunden). Bei dieser Übertragungsmethode ist es gut, wenn sich die Objekte in kleinen Schälchen befinden, die so groß sind, daß sie auch gleichzeitig zur Einbettung dienen können. Das Alkohol-Äther-Gemisch wird nach 12 Stunden schnell abgegossen und durch die 2%ige Zelloidinlösung ersetzt. Diese Lösung gebraucht mehrere Tage, bis sie in die Objekte eingedrungen ist (2—3), und die 4%ige muß die gleiche Zeitdauer einwirken. Das Durchtränken mit der 8%igen Lösung ist nun sehr vorsichtig vorzunehmen, da die Objekte hier bereits ihre definitive Lage zum Schneiden bekommen müssen. Die Objekte werden in der Lösung mit einer Nadel orientiert und das Schälchen wird mit einem Deckel verschlossen, um ein allzu schnelles Eindicken zu vermeiden. Das Eindicken darf überhaupt nicht an der freien Luft geschehen, sondern muß im Exsikkator erfolgen, dessen Luft durch ein eingestelltes Schälchen mit konzentrierter Schwefelsäure wasserfrei gehalten wird. Das Schälchen mit den Objekten wird offen in den Exsikkator gestellt, doch von Zeit zu Zeit verschlossen, damit das Eindicken der Lösung langsam vor sich geht. Mit der zunehmenden Verdunstung von Alkohol und Äther macht sich eine gallertige Beschaffenheit des Zelloidins bemerkbar. Das Einbetten ist als abgeschlossen zu betrachten, wenn die Oberfläche des Zelloidins auf einen leichten Druck mit dem Finger nicht mehr nachgibt. Man gießt dann 85%igen Alkohol auf die eingebetteten Objekte und läßt ihn mehrere Tage einwirken. Ist das Härten zur Genüge erfolgt, so schneidet man kleine Blöcke mit dem Objekt heraus und bewahrt sie in 70%igem Alkohol bis zur Bearbeitung auf.

Durch das Aufbewahren in Alkohol bekommt das Zelloidin eine knorpelige Konsistenz; es ist in diesem Zustand gut schneidbar. Die kleinen Blöcke werden mit dicker Zelloidinmasse aufgeblockt und noch kurze Zeit in 70%igen Alkohol übertragen, damit die Verbindung ganz fest wird. Zum Schneiden nimmt man möglichst viel vom überschüssigen Zelloidin fort und schneidet mit s e h r k l e i n e m Schnittwinkel. Das Messer muß mit 70%igem Alkohol befeuchtet werden, um ein Ankleben der Schnitte am Messer zu verhindern. Die Schnitte kommen in Schälchen mit 70%igem Alkohol. Serien sind nur sehr schwer und so zu erhalten, daß die Einzelschnitte sofort auf den Objektträger einzeln in der Reihe der Schnittordnung aufgeklebt werden.

Zum A u f k l e b e n benutzen wir die auf S. 37 angegebene Glyzeringelatine. Der Objektträger wird mit einem Stückchen der unverdünnten Gelatine beschickt und durch leichtes Erwärmen wird sie geschmolzen. Mit dem Finger verreibt man das Tröpfchen gut, legt nun die in Alkohol gestreckten Schnitte auf den Objektträger und drückt sie fest mit glattem Fließpapier an. Das Härten der Gelatine erfolgt in Formoldämpfen und in 10%iger wässeriger Formollösung.

Zum F ä r b e n braucht das Zelloidin nicht entfernt zu werden, man muß aber dann darauf achten, daß die Schnitte nicht zu lange im 96%igen Alkohol verweilen; absoluter Alkohol wird wegen seiner stark lösenden Wirkung besser ganz vermieden.

Nach dem Härten in Formol wird in Wasser gewaschen und die Schnitte sind jetzt fertig zum Färben.

Soll das Zelloidin gelöst werden, so geht man aus dem Waschwasser in Alkohol, von da in Alkohol-Äther und wieder in Alkohol zurück; dann Wasser und Weiterbehandlung wie bei den anderen Schnitten.

Arbeitstabelle für die Zelloidinmethode:

Die Objekte befinden sich im 96%igen Alkohol
↓
abs. Alkohol 2 Stunden
↓
Alkohol-Äther 12 Stunden
↓
Zelloidin 2%ig, 2—3 Tage
↓
Zelloidin 4%ig, 2—3 Tage
↓
Zelloidin 8%ig, bis zur knorpeligen Konsistenz des Zelloidins
↓
Ausschneiden der Objektblöcke und Härten in 85%igem Alkohol
↓
Aufbewahren in 70%igem Alkohol
↓
Aufblocken mit dicker Zelloidinlösung und Härtung in 70%igem Alkohol
↓
Schneiden mit kleinem Schnittwinkel
↓
Aufkleben der Schnitte mit Gelatine
↓
Härten der Gelatine in Formoldämpfen und in 10%iger wäss. Formollösung (wenige Minuten)

Beim Nichtentfernen des Zelloidins auswaschen in Wasser
↓
Schnitte sind fertig zum Färben

Zur Entfernung des Zelloidins übertragen in
Wasser (auswaschen)
Alkohol 96%ig
Alkohol-Äther (Lösung d. Zelloidins)
Alkohol 96%ig
Wasser
↓
Schnitte sind fertig zum Färben

Die Doppeleinbettung von Paraffin und Zelloidin geht so vor sich, daß das Objekt wie bei der Zelloidinmethode in Zelloidin eingebettet wird. Dann kommt es zum Härten in Chloroform (bis zu 12 Stunden). Das Objekt schwimmt zunächst oben auf dem Chloroform, sinkt allmählich zu Boden und ist dann meist auch gut gehärtet. Man schneidet darauf den Block unter Chloroform zurecht, läßt aber auf der Seite, mit der das Objekt später aufgeklebt wird, etwas mehr Zelloidin stehen als auf den übrigen Seiten. Das Chloroform wird nunmehr durch ein warmes Gemisch von Chloroform und geschmolzenem Paraffin (1:2) ersetzt und das Gläschen offen in den Wärmeschrank gestellt. Nach 24 Stunden bringt man das Objekt in reines Paraffin vom Schmelzpunkt 56°. Nach genügender Durchtränkung in mindestens einmal zu wechselndem Paraffin wird das Objekt in reines Paraffin eingebettet und wie ein Paraffinblock weiter behandelt. Den Verlauf der Methode veranschaulicht nebenstehende Tabelle.

Das Objekt ist in Zelloidin eingebettet (s. Arbeitstabelle oben)
↓
Härten in Chloroform (12 Stunden)
↓
Zuschneiden des Blocks
↓
Wärmeschrank: Überführen in Chloroform + Paraffin (1:2) 24 Stunden
↓
Wärmeschrank: Reines Paraffin (wenigstens 1 × wechseln)
↓
Einbetten in Paraffin
↓
Schneiden und Weiterbehandlung wie bei der Paraffinmethode

c) Die Glyzeringelatine-Methode

Die Objekte werden aus dem Wasser ganz allmählich in Glyzerin übertragen, um eine Schrumpfung durch zu schnellen Wasserentzug zu vermeiden. Man kann so vorgehen, daß man zu den Objekten, die sich in 25 ccm Wasser befinden, nach und nach in größeren Zeitabständen 20 ccm Glyzerin tropfenweise hinzufügt; oder man überschichtet die vorher angegebene Glyzerinmenge mit 25 ccm Wasser. Das Objekt wird nun ins Wasser gebracht und sinkt ganz langsam zu Boden, wobei es in immer stärkere Konzentrationen des Glyzerinwassers gerät; das Absinken kann mehrere Tage dauern.

Die zum Einbetten benötigte Glyzeringelatine stellt man sich auf folgende Weise her: in 175 ccm dest. Wasser löse man bei langsamem Erwärmen 50 g Gelatine und setze 25 g Glyzerin hinzu; die Lösung wird heiß filtriert.

Das Glyzerinwasser mit den Objekten wird mit der gleichen Menge der Gelatine gemischt und in einem verschlossenen Gefäß einer Temperatur von 40° ausgesetzt (24 Stunden). Die Objekte werden dann mit der Lösung in flache Glasschälchen übertragen und so lange im Wärmeschrank gelassen, bis die Lösung auf die Hälfte ihres Volumens eingeengt ist. Die Masse erstarrt, wenn sie der gewöhnlichen Zimmertemperatur ausgesetzt wird und enthält etwa 1 Teil Gelatine, 3 Teile Glyzerin und 1 Teil Wasser (nach Kisser, 1926). Mit einem mit Paraffinöl bestrichenen Messer schneidet man kleine Blöcke mit den Objekten heraus und härtet sie in 96 %igem Alkohol, der nach 24 Stunden einmal gewechselt werden muß. Um ein allseitiges Umspülen mit Alkohol zu erreichen, befestigt man die Blöcke mit einer Nadel an einem Kork, füllt eine Glastube voll Alkohol und setzt den Kork auf; das Objekt taucht nun nach unten vollständig in den Alkohol ein. Die Zeit des Härtens richtet sich nach der Größe des Blocks und man rechnet für jeden Millimeter einen Tag; ist also das Objekt mit einer 6 mm dicken Schicht (das Maximum!) von Gelatine umschlossen, so muß der Block 6 Tage im Alkohol bleiben.

Die gehärteten Blöcke werden mit Glyzeringelatine aufgeblockt, mit schräg gestelltem Messer geschnitten und die Schnitte mit Eiweißglyzerin aufgeklebt. Man drückt die Schnitte mit Zigarettenpapier fest an den Objektträger an und läßt das Eiweiß bei einer Temperatur von 60—65° gerinnen (koagulieren). Das Herauslösen der Gelatine aus den Schnitten erfolgt durch eine 5 %ige Lösung von Kalziumchlorid in 70 %igem Alkohol.

Arbeitstabelle für die Glyzeringelatine-Methode:

Die Objekte befinden sich im Wasser

↓

Langsames Übertragen in Glyzerinwasser

a) Zu 25 ccm Wasser mit den Objekten setzt man tropfenweise 20 ccm Glyzerin oder
b) Glyzerin wird mit Wasser überschichtet; die Objekte sinken hindurch

↓

Zum Einbetten gleiche Mengen Glyzerinwasser und Gelatine mischen

↓

Objekte in dieser Lösung 24 Stunden in den Wärmeschrank stellen

↓

Übertragen in flache Glasschalen und im Wärmeschrank die Lösung auf ½ des Volumens einengen

↓

Zuschneiden der Blöcke (Messer mit Paraffinöl bestreichen!)

↓

Härten in 96 %igem Alkohol (1—6 Tage je nach der Dicke)

↓

Aufblocken mit Glyzeringelatine und schneiden mit schräggestelltem Messer

↓

Aufkleben der Schnitte mit Eiweißglyzerin

↓

Herauslösen der Gelatine (5 %ige Lösung von Kaliumchlorid in 70 %igem Alkohol)

↓

Übertragen in 50 %igen Alkohol

↓

Übertragen in Wasser

↓

Schnitte sind fertig zum Färben.

14. Das Färben

Bei der Aufstellung der Arbeitstabellen für die Paraffin-, Zelloidin- und Glyzeringelatine-Methode wurde die Durchführung der Präparate bis ins Wasser vorgeschrieben. Hier muß darauf hingewiesen werden, daß eine Überführung der Präparate bis ins Wasser nicht immer notwendig ist, besonders wenn mit alkoholischen Farblösungen gearbeitet werden soll. Es macht aber keine Mühe, die Präparate bis in die betreffende Alkoholstufe zurückzubringen und die Angabe in den Arbeitstabellen liegt im Interesse einer einheitlichen Behandlung.

Bei der Färbung können zwei verschiedene Wege eingeschlagen werden: die Schnittfärbung und die Stückfärbung. Bei der Stückfärbung wird das Objekt vor dem Einbetten gefärbt, doch muß beachtet werden, daß nicht alle Objekte sich dafür eignen und auch nicht alle Farben gut eindringen. Die Stücke dürfen nicht zu groß sein und die Farben dürfen keinen mazerierenden Einfluß auf das Objekt ausüben. Man wird zu dieser Methode — die bei den Zoologen gebräuchlicher ist, — erst greifen, wenn viel Material verarbeitet werden soll.

Die Färbung von Einzelschnitten nimmt man am besten in Uhrschälchen oder Salz-

näpfchen vor. Mit dem Spatel oder der Nadel werden die Objekte von einer Lösung in die andere übertragen. Die Schälchen sind stets verdeckt zu halten; einmal um einer Verschmutzung durch Staub vorzubeugen, andererseits kann aber auch durch die Verdunstung eine stärkere Konzentration der Farblösung hervorgerufen werden und die Abscheidung von Kristallen usw. in den Objekten wäre die Folge. Beim Schneiden von uneingebettetem Material (vgl. S. 16) wird man die Schnitte in dieser Weise durch die Farbe führen.

Zum Färben von aufgeklebten Schnitten benutzt man die auf S. 28 beschriebenen Küvetten, die eine große Zahl von Objektträgern aufnehmen können und ein außerordentlich reinliches Arbeiten gewährleisten. Die bei den verschiedenen Färbemethoden anzuwendenden Flüssigkeiten sind recht verschiedener Art und eine Norm für die Behandlung kann hier nicht gegeben werden.

Bei der Färbung können wir zwischen histologischer und zytologischer Färbung unterscheiden. Da aber die Gewebe der Pflanzen viel einfacher sind als die der Tiere, kommt man meistens mit den für die zytologische Färbung gebräuchlichen Stoffen aus; die Färbung des Zellinhaltes ist die Hauptsache. Unterschieden wird ferner zwischen progressiver und regressiver Färbung. Bei der progressiven Färbung muß die Farbstofflösung so lange auf die Schnitte einwirken, bis die zu färbenden Bestandteile eine genügende Menge der Farbe gespeichert haben. Es werden nur ganz bestimmte Teile des Objekts (z. B. die Kerne der Zellen) angefärbt und die übrigen Teile bleiben weit dahinter zurück. Unter dem Mikroskop beobachte man von Zeit zu Zeit den Fortschritt der Färbung und breche ab, wenn die zu beobachtenden Teile den gewünschten intensiven Farbton erreicht haben. Wird das Gewebe zuerst diffus gefärbt, d. h. dringt der Farbstoff in alle Zellbestandteile gleichmäßig ein, so muß später ein Teil der Farblösung wieder entfernt werden. Das Auswaschen wird mit einer bestimmten Flüssigkeit vorgenommen und da einige Bestandteile der Zellen den Farbstoff besser festhalten als andere, kann mit dem Auswaschen abgebrochen werden, wenn der gewünschte Farbton erreicht ist (regressive Färbung); das Ausziehen der Farbe nennt man differenzieren (s. S. 34: Färbung mit Eisenhämatoxylin nach Heidenhain).

Zur Erzielung eines intensiven Farbtons können die Objekte vor dem Färben mit besonderen Agenzien behandelt, „gebeizt“ werden; die Gewebe werden empfänglich gemacht für das Aufnehmen der Farbe.

Über die Einwirkungsdauer kann schwer etwas Bestimmtes gesagt werden, da die Objekte infolge ihrer spezifischen Eigenheit und Fixierung ganz verschieden reagieren. Für Anfänger ist es zu empfehlen, die Färbung in bestimmten Zeitabständen zu unterbrechen und die Wirkung unter dem Mikroskop zu kontrollieren. Bei der progressiven Färbung wird man leicht erkennen können, ob der Grad der Intensität bereits erreicht ist oder nicht; bei der regressiven Färbung ist dies bedeutend schwerer; man richtet sich hier am besten nach den angegebenen Minimalzeiten. Auch das Kontrollieren unter dem Mikroskop will durch Übung gelernt sein, da die Schnitte in Wasser oder Alkohol ein ganz anderes Bild der Färbung geben als im Einschluß von Kanadabalsam. Die Medien (Wasser und Alkohol) sind außerordentlich schwach lichtbrechend und besonders die Färbung von plasmareichen Zellen erscheint später im Kanadabalsam (höherer Brechungsexponent) als recht schwach.

Nach der Zahl der zur Einwirkung gebrachten Farbstofflösungen unterscheidet man zwischen der Einfach- und Mehrfachfärbung. Bei der Mehrfachfärbung kommen die Objekte entweder nacheinander in verschiedene Farblösungen oder sie werden mit einem Gemisch von Farben behandelt. Die Doppelfärbung bezweckt meistens die Erreichung einer Farbdifferenz zwischen Kern und Plasma.

Es gibt eine riesige Zahl von Farbstoffen, die eine gute Färbung der Objekte hervorrufen, doch kann es sich hier nicht um eine möglichst vollständige Beschreibung aller Färbemethoden handeln; es sollen vielmehr nur einige einfache, sichere und allgemein gebräuchliche Färbemethoden besprochen werden. Peinlichst genaues und sauberes Arbeiten ist Vorbedingung zur Erzielung einer guten Färbung und es ist unbedingt notwendig, daß die richtigen Farbstoffe angewandt werden, die man als fertige Lösungen oder als Substanz von der Geschäftsstelle des Mikrokosmos beziehen kann.

a) Das Färben mit Karminaten

Karmin ist ein tierischer Farbstoff, der aus der Cochenille hergestellt wird. Die Färbungen mit Karmin sind in den verschiedensten Einschlußmitteln gut haltbar, doch dürfen die Objekte nicht mit Chromgemischen fixiert worden sein.

Karmalaun nach P. Mayer. In 200 ccm destilliertem Wasser wird unter Erwärmen 10 g Kalialaun und 1 g Karmin-

säure gelöst. Die abgesetzte Lösung wird nach dem Erkalten filtriert und mit einem Antiseptikum (1 ccm Formol) versetzt. Die Lösung ist lange haltbar, schlägt aber allmählich am Boden und an den Wänden des Gefäßes Farbe ab und daher muß vor dem Gebrauch filtriert werden. Auf Schnitte läßt man sie ein bis mehrere Stunden einwirken und erzielt dadurch gute Färbungen der Kerne und der unverholzten Zellwände. Ist das Plasma mitgefärbt, dann differenziert man mit einer 1%igen Kalialaunlösung oder mit angesäuertem Wasser (½%ige Salzsäure).

Eisenkarmalaun nach de Groot gibt noch stärkere Kernfärbungen als Karmalaun. Zur Bereitung fügt man zu der vorher angegebenen Lösung von Kalialaun und Karminsäure noch 0,1 g Eisenalaun und nach dem Filtrieren zwei Tropfen Salzsäure und etwas Thymol hinzu. Für Schnittfärbung verdünnt man die Lösung mit 800 ccm 5%iger Kalialaunlösung, gibt 10 Tropfen Salzsäure und einige Thymolkristalle hinzu; die Lösung ist jahrelang haltbar.

b) Das Färben mit Hämatoxylinfarben

Hämatoxylin ist ein aus dem Blauholz (*Haematoxylon campechianum*) gewonnener Farbstoff. Die Lösungen sind in frischem Zustand unbrauchbar, sie müssen reifen, d. h. das Hämatoxylin muß erst zu Hämatein und noch höheren Stufen oxydieren. Das Oxydieren beansprucht, wenn die Lösung sich selbst überlassen bleibt, mehrere Wochen, doch kann durch energische Oxydationsmittel (Kaliumpermanganat) das Reifen sehr beschleunigt werden. In Verbindung mit einem Metall (Aluminium, Eisen, Chrom) ergeben die Lösungen sehr kräftige blaue oder schwarze Färbungen.

Hämatein ist im Handel zu haben, doch kann man sich zur Bereitung der Lösung auch Hämateinammoniak selbst herstellen. Zu einer Lösung von 1 g Hämatoxylin in 20 ccm destilliertem Wasser (erwärmen!) setzt man 1 ccm Ammoniak hinzu, gießt die Flüssigkeit in einer flachen Schale aus und läßt sie an einem staubfreien Ort unter dem Einfluß des Sonnenlichtes eindampfen. Der abgekratzte Rückstand ist ein Pulver, das sich in Alkohol oder Wasser löst und mit Essigsäure keine merkliche Trübung gibt. Sind nach dem Abdampfen Kristalle vorhanden, so ist zu schnell verdampft worden; die Lösung muß frisch angesetzt werden.

Saures Hämalaun nach P. Mayer. In 50 ccm 90%igem Alkohol löst man 1 g Hämatein oder Hämateinammoniak und setzt eine Lösung von 50 g Kalialaun in 1000 ccm destilliertem Wasser hinzu. Um die Farbe haltbar zu machen und um eine schärfere Färbung der Objekte zu erzielen, versetzt man je 100 ccm der Lösung mit 2 ccm Eisessig; die Farbe ist gleich zum Gebrauch fertig. Bei längerem Stehen bilden sich am Boden und an den Wänden des Aufbewahrungsgefäßes Niederschläge; zur Entnahme der Lösung aus der Flasche nimmt man deshalb mit einer Pipette aus der Mitte der Flasche die gewünschte Menge.

Die Objektträger mit den Schnitten werden aus destilliertem Wasser in die Farbe übertragen; die Färbung ist sofort oder nach einigen Minuten beendet. Darauf wird in destilliertem Wasser abgespült und in mehrfach zu wechselndem Leitungswasser nachgespült; die Färbung nimmt hier einen tiefblauen Ton an. Zur Erzielung einer ganz reinen Kernfärbung differenziere man in Salzsäurealkohol (2 ccm konz. Salzsäure auf 100 ccm Alkohol), wasche nach beendeter Differenzierung in Alkohol gründlich aus und übertrage in Leitungswasser, das so oft gewechselt wird, bis der dunkelblaue Ton erreicht ist. Die Kernfärbungen sind sehr schön.

Alaunhämatoxylin nach Delafield. Zu einer gesättigten Lösung von Ammoniakalaun in 400 ccm destilliertem Wasser fügt man eine Lösung von 4 g Hämatoxylin in 25 ccm Alkohol. Das Gemisch läßt man 3—4 Tage offen stehen, filtriert und versetzt es mit je 100 ccm Glyzerin und Methylalkohol. Nachdem diese Lösung 2—3 Monate offen gestanden hat, wird sie nochmals filtriert, auf Flaschen gefüllt und luftdicht abgeschlossen. Die Lösung wird als Stammlösung benutzt. Zum Färben wird sie stark mit destilliertem Wasser verdünnt und nach dem Färben werden die Objekte in destilliertem Wasser ausgewaschen und in Leitungswasser gebläut. Kerne und Zellulosewände werden rasch und stark gefärbt, verholzte Zellwände erscheinen in bräunlichem Farbton.

Eisen-Hämatoxylin nach Heidenhain. Diese Färbemethode hat die größte Bedeutung in der Botanik erlangt; sie ist dem Anfänger wegen der Sicherheit der Ergebnisse sehr zu empfehlen. Zum Färben müssen die Schnitte mit einer 3%igen Eisenalaunlösung (Eisenoxydammonsulfat) vorbehandelt werden. Die Färbelösung stellt man sich aus einer 10%igen alkoholischen Hämatoxylinlösung her (mindestens 4 Wochen im Dunkeln reifen lassen), indem man 1 Teil mit 9 Teilen destilliertem Wasser verdünnt.

Nach unserer Arbeitstabelle auf S. 29 befinden sich die Schnitte im Wasser und bei dieser Färbemethode ist nun folgender Gang der Behandlung notwendig: Die Objektträger mit den Schnitten kommen aus dem Wasser, das man sorgfältig ablaufen läßt, in die Eisenalaunlösung, in der sie wenigstens 2 Stunden bleiben müssen. Ein längeres Verweilen (bis zu 12 Stunden) schadet nicht und ist manchmal sogar notwendig. Nachdem die Eisenalaunlösung genügend lange eingewirkt hat, nimmt man die Objektträger heraus und spült sie mit reinem Leitungswasser 3—4mal gründlich ab. Man kann dabei so vorgehen, daß die Objektträger in einer Küvette dem Wasserstrahl ausgesetzt werden oder man

stellt 4 Schalen mit reinem Wasser nebeneinander auf und schwenkt die Objektträger in jeder Schale kurz ab. Das von außen an den Schnitten und an dem Objektträger haftende Eisenalaun wird dadurch entfernt und die Schnitte sind fertig zum Färben. Schon früher wurde darauf hingewiesen, daß die Objektträger in der Küvette wegen der Platzersparnis paarweise Rücken- gegen Rückenfläche eingestellt werden können. Beim Übertragen von Eisenalaun ins Wasser sind die Objektträger einzeln zu behandeln, damit keine Flüssigkeitsreste verschleppt werden. Das Abspülen im Wasser muß schnell vor sich gehen, da sonst eine zu starke Auswaschung des Eisenalauns aus den Schnitten erfolgen würde. Jetzt können die Objektträger wieder paarweise zusammengefaßt und in die Hämatoxylinlösung übertragen werden. In der Färbelösung verweilen die Objektträger 2—24 Stunden und unter dem Mikroskop erscheinen die Schnitte nach dieser Zeit diffus tiefschwarz gefärbt. Zur Weiterbehandlung muß die Farbe aus den Schnitten zum Teil wieder entfernt werden, doch bevor das Differenzieren vorgenommen wird, bringt man die Objektträger einzeln in Leitungswasser, um die anhaftende Farblösung abzuspülen. Differenziert wird mit einer 3%igen Eisenalaunlösung, die nur für diese Zwecke (nicht zum Beizen) benutzt werden darf. Am besten werden die Objektträger in eine flache Schale gelegt und mit der Eisenalaunlösung übergossen. Man sieht, wie langsam die Farbe entweicht und muß dauernd unter dem Mikroskop beobachten, ob der Farbentzug bereits den gewünschten Grad erreicht hat. Sind die Schnitte genügend entfärbt, befindet sich also die Farbe nur noch in den Bestandteilen, die genau beobachtet werden sollen, dann unterbricht man das Differenzieren und spült in Leitungswasser gründlich ab, um auch jede Spur von Eisenalaun zu entfernen. Die Schnitte dürfen nicht länger als ¼ Stunde im Wasser bleiben und müssen dann zum Einschluß in Harz weitergeführt werden (vgl. S. 38). Bei gut gelungener Färbung erscheinen die Kerne tiefschwarz bis blauschwarz, während das Plasma nur einen ganz zarten grauen Ton angenommen hat.

Arbeitstabelle:

Die Schnitte befinden sich in Wasser
↓
Beizen in einer 3%igen Eisenalaunlösung (2—12 Stunden)
↓
Gründliches und schnelles Auswaschen in fließendem Wasser
↓
Überführen in die Farbe (Einwirkungsdauer 2—24 Stunden)
↓
Nach dem Färben abspülen in Wasser
↓
Differenzieren der Schnitte in Eisenalaun
↓
Abspülen in Wasser und weiterführen zum Einschluß in Harz

c) Das Färben mit Teerfarben

Während die bisher beschriebenen Farbstoffe wesentlich die Kerne der Zellen färben und das Plasma nur ganz leicht andeuten, ist es bei den Teerfarben so, daß Kern- und Plasmafärbungen in gleicher Stärke erzielt werden können. Aus der Reihe der Teerfarben sollen von Kernfarbstoffen Gentianaviolett, Safranin, Fuchsin und Methylgrün und von Plasmafarbstoffen Anilinblau, Säurefuchsin, Eosin, Lichtgrün S. F. und Orange G besprochen werden.

Gentianaviolett. Die Schnitte werden mit einer 1%igen wässerigen Lösung gefärbt und in schwach essigsaurem Wasser oder Säurealkohol differenziert. Die Kernfärbung ist gut und haltbar, das Plasma bleibt fast farblos.

Safranin darf nur angewandt werden, wenn die Objekte mit Chrom- oder Osmiumsäure fixiert worden sind. Nach anderen Fixierungen gelingt die Färbung meistens nicht gut, doch kann man dadurch abhelfen, daß man die Schnitte vor dem Einstellen in die Farbe 2 Stunden mit 1%iger Chromsäure beizt und ¼ Stunde auswäscht. — Zur Herstellung der Farbe löst man 2 g Safranin in 100 ccm 50%igem Alkohol und setzt zur Konservierung 2 ccm Anilinwasser hinzu; die Lösung ist nach einigen Stunden fertig zum Gebrauch. Die Schnitte werden 2—8 Stunden in die Farbstofflösung eingestellt, dann mit destilliertem Wasser ausgewaschen und in 96%igen Alkohol übertragen. Das Differenzieren muß vorsichtig und schnell in Säurealkohol vorgenommen werden, da die Farbe sehr schnell ausgezogen wird; auswaschen in Leitungswasser. Die chromatischen Kernbestandteile werden leuchtend rot gefärbt, das Plasma bleibt farblos.

Fuchsin. Man wendet eine starke Lösung in 50%igem Alkohol an und differenziert in Salzsäurealkohol. Besser ist die Zimmermannsche Methode: Die Schnitte kommen für 15 Minuten in eine starke wässerige Lösung von Fuchsin und werden dann zur Erzielung einer dunkelvioletten Färbung mit konz. Pikrinsäurelösung in einem Gemisch von 2 Teilen Wasser und 1 Teil Alkohol behandelt. Danach werden sie in 96%igem Alkohol so lange gewaschen, bis keine Farbe mehr entweicht und über absoluten Alkohol und Xylol in Harz eingebettet.

Methylgrün ist ein guter Chromatinfarbstoff, doch ist die Haltbarkeit leider nicht gut. Wird mit diesem Farbstoff gearbeitet, so sind alle Lösungen durch einen Zusatz von Essigsäure schwach anzusäuern, da er gegen Alkalien außerordentlich empfindlich ist. Gefärbt wird mit einer Lösung von 1 g Methylgrün in 100 ccm dest. Wasser. Die Färbung ist in 5 bis 10 Minuten beendet, und nachdem in dest. Wasser ausgewaschen ist, kann noch mit 70%igem Alkohol differenziert werden.

Anilinblau wird als 1%ige wässerige Lösung hergestellt und zum Färben beliebig verdünnt. Die Objekte dürfen nicht zu lange in der Farbe bleiben und müssen nach beendeter Färbung gründlich mit Wasser ausgewaschen werden. Die Plasmafärbung ist haltbar und hebt sich gut ab gegen rote Kernfarben.

Säurefuchsin wird wie Anilinblau als Gegenfarbe zu violetten und blauen Kernfärbungen gerne benutzt. Erst wird die Kernfarbung vorgenommen und das Plasma mit einer 1%igen wässerigen Lösung von Säurefuchsin nachgefärbt. Bei Überfärbung werden die Schnitte in Leitungswasser ausgewaschen; durch Essigsäurezusatz zum Wasser kann man die Färbung verstärken.

Eosin färbt den gesamten plasmatischen Inhalt der Zellen rot (1%ige Lösung 10- bis 20fach mit dest. Wasser verdünnen, 5 Minuten färben), jedoch müssen die Schnitte etwas überfärbt werden, da beim späteren Auswaschen in Wasser und Alkohol ein Teil der Farbe verloren geht.

Lichtgrün S.F. 1 g wird in 100 ccm dest. Wasser oder in 70—90%igem Alkohol gelöst. Die Färbung ist gut, aber nicht haltbar.

Orange G. gibt in kurzer Zeit (1 bis 5 Minuten) eine außerordentlich scharfe und haltbare Plasmafärbung. Gebraucht wird eine 0,1—0,5%ige Lösung in dest. Wasser.

d) Mehrfachfärbungen

Die Teerfarben der beiden besprochenen Gruppen lassen Doppelfärbungen zu, wenn sie nacheinander angewandt werden. Kern und Plasma werden mit verschiedenen Stoffen gefärbt und heben sich scharf voneinander ab, doch ist es dabei nicht ganz gleichgültig, welche Farbstoffe man kombiniert. Es kommt auf den Kontrast an, der erzielt werden muß und so ergeben sich Gegenüberstellungen wie rot und blau, rot und grün. Die Hämatoxylinfarben mit ihrem dunkelblauen oder schwarzen Farbton kombiniert man am besten mit roten oder grünen Gegenfarben.

Von den zeitlich getrennten Färbungen ist die Flemmingsche Dreifachfärbung besonders beliebt, für den Anfänger aber nicht ganz leicht auszuführen. Man kombiniert dabei Safranin, Gentianaviolett und Orange G. Die Schnitte kommen aus dem Wasser zuerst für 6—8 Stunden in die Safraninlösung (Vorbedingung ist Chromsäurefixierung oder Chromsäurebeizung, vgl. S. 10), werden mit Salzsäurealkohol differenziert und in Wasser abgespült. Gentianaviolett (1%ige wässerige Lösung) muß dann 2—10 Minuten einwirken und der überschüssige Farbstoff wird in Leitungswasser abgespült. Die letzte Färbung mit Orange G. wird so vorgenommen, daß die Farblösung 1—5 Minuten über die Schnitte auf dem Objektträger läuft. Nach beendeter Färbung wäscht man mit Wasser, differenziert mit Alkohol, wartet, bis kein Farbstoff mehr austritt und überträgt in Nelkenöl. Jetzt können die Schnitte in Harz eingeschlossen werden. Bei gut ausgefallener Färbung zeigen sich die Chromosomen der Kernteilungsfiguren rot, die Spindelfasern bläulich und das Plasma gelbbraun.

Safranin-Lichtgrün S.F. Die Schnitte werden mit Safranin wie bei der Dreifachfärbung gefärbt und in Wasser abgespült. Für die Färbung mit Lichtgrün stellt man sich eine besondere Lösung in 70—90%igem Alkohol (so viel Farbstoff lösen, daß die Lösung hellgrün scheint) her und setzt auf je 100 ccm 2 Tropfen Salzsäure hinzu. Mit einer Pipette trägt man das Lichtgrün auf den Objektträger auf; die Lösung erfüllt einen doppelten Zweck: das Plasma wird gefärbt und durch den Gehalt an Säure wird Safranin herausdifferenziert. Unter dem Mikroskop beobachte man den Fortschritt der Färbung und Differenzierung und wasche nach Eintritt des gewünschten Stadiums mit Alkohol aus.

Neben diesen Methoden der Mehrfachfärbungen, die eine Anwendung der einzelnen Farbstoffe nacheinander verlangen, sei noch eine Mehrfachfärbung beschrieben, bei der die Farbstoffe gleichzeitig als Gemisch auf die Schnitte einwirken. Zur Pianese-Färbung vereinigt man folgende Farbstoffe in Lösung: Malachitgrün 0,5 g, Säurefuchsin 0,1 g, Martiusgelb 0,01 g, dest. Wasser 150 ccm, 96%iger Alkohol 50 ccm. Die Schnitte kommen vom Wasser in 96%igen Alkohol und von da ins Farbgemisch (24 Stunden). Nach der Färbung wäscht man die überschüssige Farbe in Wasser aus, differenziert in 96%igem Alkohol und in Salzsäurealkohol (1 Tropfen Salzsäure auf 200 ccm Alkohol). Das Differenzieren geht sehr rasch vor sich und ist beendet, wenn die Farbe des Protoplasmas von grün in rot umschlägt. Der Salzsäurealkohol wird in 96%igem Alkohol ausgewaschen und die Schnitte über Nelkenöl und Xylol in Harz übertragen. Die Pianesefärbung gibt nach Sieben (1913) besonders gute Resultate bei solchen Objekten, die mit Alkohol-Eisessig oder nach Juel fixiert worden sind.

Wie schon vorher gesagt wurde, spielen die histologischen Färbungen neben den zytologischen eine nur untergeordnete Rolle, doch können sie wertvoll sein, wenn es sich darum handelt, einzelne Elemente gegeneinander abzusetzen. In Demonstrationspräparaten werden Farbenkontraste immer einer schnellen Orientierung dienen können.

Vorbedingung für gute Membranfärbungen ist die Entfernung des Zellinhaltes, die man am besten mit Eau de Javelle vornimmt (vgl. S. 7). Die Schnitte werden aus Wasser für kurze Zeit in die Lösung übertragen (½ bis 1 Stunde) und nacheinander in Wasser, wässeriger Essigsäure (1%ig) und Wasser ausgewaschen; dann erst kann die Einwirkung der Farbe

erfolgen. Ein zu langes Verweilen der Schnitte in der Lösung ist nicht anzuraten, da die Membranen leicht angegriffen werden.

Unverholzte Membranen werden mit Hämatoxylin nach Delafield, mit Karmalaun oder Eosin gefärbt. Noch bessere Resultate soll nach Kisser (1926) die Färbung mit Mucikarmin ergeben. In einer Porzellanschale werden 1 g Karmin, 0,5 g Aluminiumchlorid in 2 ccm dest. Wasser auf kleiner Flamme erwärmt, bis das Gemisch dunkel geworden ist. Nachdem 100 ccm 50%iger Alkohol in kleinen Mengen nach und nach zugefügt worden ist, filtriert man nach 24 Stunden. Ungelöstes Karmin darf nur in geringer Menge als Bodensatz vorhanden sein. Die Lösung ist als Stammlösung zu betrachten; zum Gebrauch muß sie mit 5—10 Teilen Leitungswasser oder 50—70%igem Alkohol verdünnt werden. Sie ergibt eine ausgezeichnete Rotfärbung.

Verholzte Membranen werden durch Methylgrün sehr schnell gefärbt und die Färbung ist lange haltbar. Auch Safranin gibt gute Färbungen, nur muß es eine Stunde einwirken und die überschüssige Farbe mit Salzsäurealkohol ausgezogen werden. Rotviolette Töne erzielt man bei Anwendung von Pikrin-Fuchsinsäure (vergl. Fuchsin).

15. Das Einschließen der Präparate

Gefärbte und ungefärbte Schnitte müssen, wenn sie längere Zeit erhalten werden sollen, in einem Medium eingeschlossen werden, das sowohl konserviert als auch einen Brechungsexponenten besitzt, der für die Beobachtung günstig ist. Wir können die Einschlußmittel in zwei große Gruppen einteilen: wässerige Einschlußmittel und Harze und Balsame. Die Entscheidung für die eine oder die andere Gruppe wird durch das Präparat selbst bestimmt.

a) Die wässerigen Einschlußmittel sind vornehmlich für solche Objekte bestimmt, die in ungefärbtem Zustand beobachtet werden sollen und die keinen zu starken Wasserentzug vertragen. Sind die Schnitte sehr fein, so ist es nicht günstig, sie sofort in das Einbettungsgemisch zu übertragen; man schalte vielmehr eine schwache Lösung des Gemisches vor und übertrage dann.

Glyzeringelatine gehört zu den am einfachsten zu handhabenden Medien; die Übertragung der Schnitte macht keine besonderen Schwierigkeiten. Die fertigen ungefärbten Schnitte werden vor der Einbettung in eine wässerige Glyzerinlösung übertragen und darin für 12 Stunden belassen. Inzwischen stellt man sich eine Gelatine folgender Zusammensetzung her: 50 g Glyzerin, 7 g reinste Gelatine und 42 ccm dest. Wasser. Die Gelatine wird in dest. Wasser bis zum Schmelzen erwärmt und dann die Lösung mit dem Glyzerin unter Zusatz von 1 g Karbolsäure vermischt. Beim Erkalten erstarrt diese Gelatine; sie muß daher zur Einbettung auf einem Wasserbad verflüssigt werden. Die Objekte werden auf den gereinigten Objektträger übertragen und von dem verflüssigten Medium läßt man einen Tropfen auf das Objekt aus nicht zu großer Höhe fallen. Das Auflegen des Deckglases muß vor dem Erstarren der Gelatine geschehen, damit sich die Flüssigkeit gleichmäßig unter dem Deckglas ausbreitet. Einige Vorsichtsmaßregeln müssen bei diesem Handgriff genau beachtet werden. Vom Auflegen des Deckglases hängt es ab, ob das Präparat später gut brauchbar sein wird; die sich bei falschem Auflegen einschleichenden Luftblasen müssen unbedingt vermieden werden. Das Deckglas wird mit einer Breitkante zuerst auf den Objektträger aufgelegt und hier mit dem Zeigefinger der linken Hand oder der Präpariernadel gestützt (s. Abb. 1). Die Gelatine breitet sich gleichmäßig an dieser Kante aus und bei langsamem Niedersenken wird sich die Einschlußflüssigkeit glatt unter dem Deckglas verteilen. Auch das Anhauchen des Deckglases kann förderlich sein: es überzieht sich dabei mit einem feinen Flüssigkeitshäutchen und die Verbindung mit dem Einbettungsmedium wird besser hergestellt. Die Gelatine muß den ganzen Raum unter dem Deckglas einnehmen, darf jedoch in nicht zu starkem Maße unter den Rändern hervordringen. Nach einigen Einbettungen wird man schon eine gewisse Übung in der Abschätzung der Menge des Mediums erlangen. Färbungen erhalten sich in der Glyzeringelatine nicht gut.

Das Hoyersche Gemisch ist ein wässeriges Einschlußmittel, das den letztgenannten Nachteil der Glyzeringelatine nicht besitzt; es können daher mit Karmin und Hämatoxylin gefärbte Objekte sehr gut darin eingeschlossen werden. Zur Herstellung füllt man ein Gefäß zu $^2/_3$ mit reinen Stückchen von Gummi arabicum und gibt als letztes Drittel eine Chloralhydratlösung hinzu, die 5—10% Glyzerin enthält. Nach einigen Tagen entsteht ein dicker Sirup. Zeigen sich nach der Filtrierung durch dickes Fließpapier noch Trübungen, so wird weiter mit Chloralhydrat angereichert und nochmals filtriert. Sollen Präparate eingeschlossen werden, die mit Teerfarben gefärbt sind, dann benutzt man zum Lösen des Gummi arabicums keine Chloralhydratlösung, sondern eine Kaliumazetatlösung.

Mit dem Übertragen der Objekte in diese Medien ist der Vorgang des Einschließens noch nicht beendet. Es könnte vorkommen, daß die Präparate nach einiger Zeit beschlagen und um sie vor dem Verderben zu bewahren, wird um das Deckglas herum ein

fester Randverschluß gelegt. Die Glyzeringelatine-Präparate müssen aber vor dem Umlegen des Randverschlusses vier Wochen an einem staubfreien Ort aufbewahrt und das unter dem Deckglas hervorgetretene Medium sorgfältig entfernt werden, weil sonst der Verschluß nicht halten würde. Zum Umranden verwenden wir entweder den Königschen Lack oder den allgemein gebräuchlichen Asphaltlack, auch der Maskenlack, den man mit einem Pinsel aufträgt, ist recht gut. Die Methode ist bei den beiden zuerst erwähnten Substanzen gleich und leicht ausführbar. Man erwärmt einen Deckglasspatel (Abb. 18) (den man übrigens auch selbst herstellen kann, indem man einen Draht zu einem langen gestreckten Rechteck umbiegt, dessen Längsseite länger als das Deckglas sein muß, und dessen Stiel man in einem Federhalter befestigt) über der Spiritusflamme und stößt ihn in das Harz, das sofort schmilzt. An dem vorderen Bügel des Spatels bleibt eine genügende Menge Harz hängen, das man als Kittsaum auf den Objektträger in 2 mm Entfernung von dem Deckglasrand aufträgt. Vorher muß alle Feuchtigkeit rings um das Deckglas entfernt werden, um ein Spritzen des heißen Harzes zu verhindern. Nun erwärmt man den Spatel von neuem und bringt damit flüssigen Kitt auf das Deckgläschen, das einen 2 mm breiten Lacksaum erhält. Dann erwärmt man den Spatel nochmals, füllt den Zwischenraum mit Harz aus und glättet den ganzen Verschluß. Diese Prozedur wiederholt man für die übrigen Seiten. Bei runden Deckgläsern ist in ähnlicher Weise zu verfahren. Hat man keine sichere Hand, so benutzt man dazu einen sogenannten Drehtisch (Abb. 19).

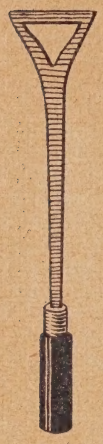


Abb. 18. Deckglas spatel

b) In Harze und Balsame wird man meistens nur gefärbte oder solche Objekte einschließen, die eine starke Eigenfarbe besitzen und eine Aufhellung durch die Intermedien vertragen können. Bei diesen Einschlußmitteln ist eine unmittelbare Übertragung nicht möglich und bevor auf sie näher eingegangen wird, muß kurz auf die Vorbehandlung der Objekte hingewiesen werden. Nehmen wir an, daß es sich um die Weiterbehandlung einer gefärbten Schnittserie handelt, so ist, wie folgt, zu verfahren: Die Schnitte befinden sich nach dem Färben und Differenzieren in dest. Wasser oder in Alkohol. Zur Weiterverarbeitung ist es daher notwendig, die Objektträger durch die Alkoholreihe aufwärts zu führen. Vom 70—96 %igen Alkohol aus kann man verschiedene Intermedien zur Überführung ins Einschlußmittel benutzen:

Xylol. Die in 96 %igem Alkohol sorgfältig entwässerten Objekte werden nacheinander in Xylol—Alkohol (1 : 1) und reines Xylol übertragen, bis keine Schlierenbildung mehr auftritt. Aus dem Xylol nimmt man den Objektträger zur Einbettung der Schnitte heraus, entfernt alle Spuren von Xylol vom Glas, bedeckt die Schnitte mit 1—3 Tropfen Kanadabalsam und legt das Deckglas auf.

Terpineol. Es mischt sich schon mit 85—90 %igem Alkohol, so daß die Schnitte nicht sehr sorgfältig entwässert zu werden brauchen. Einschlußvorgang wie beim Xylol.

Zedernholzöl. Die Überführung in dieses Intermedium, das zu den besten gehört, verlangt eine sehr sorgfältige Entwässerung der Schnitte in 96 %igem Alkohol.

Während diese Zwischenstufen die Färbungen der Schnitte nicht angreifen, ist das Arbeiten mit

Nelkenöl nicht ganz ungefährlich, da es besonders auf Teerfarben einen stark aufhellenden Einfluß ausübt. Die Schnitte können aus 70—80 %igem Alkohol gleich in Nelkenöl übertragen werden; sie müssen jedoch, wenn die Färbung nicht leiden soll, von Nelkenöl wieder über Xylol geführt werden, damit auch jede Spur entfernt wird. Vom Xylol überträgt man die Schnitte ins Einschlußmittel.

Die gebräuchlichsten Einschlußmittel sind Kanadabalsam, Venetianer Terpentin und Dammarharz.

Kanadabalsam (Harz von *Abies Balsamae*) ist in Xylol gelöst und muß in besonderen Gläsern mit Überfalldeckel aufbewahrt werden (sogen. Balsamglas). Die Schnitte werden über Xylol zur Einbettung gebracht.

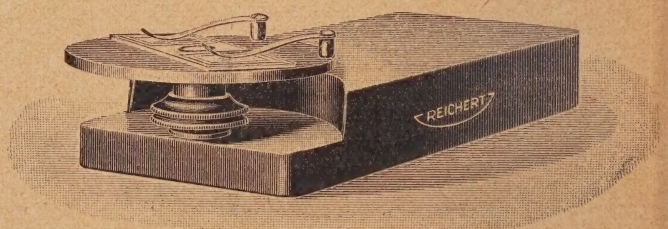


Abb. 19. Drehtisch zum Anfertigen von Lackringen auf mikroskopischen Präparaten, mit Holzklotz zum Auflegen der Hand

Venetianer Terpentin (Harz von Lärche (*Larix*)). Zur Bereitung verdünnt man das Harz mit dem gleichen Volumen Alkohol, erwärmt auf dem Wasserbad und gießt die klare Lösung oben ab.

Vor dem Kanadabalsam hat diese Flüssigkeit den Vorteil, daß sie sich bereits mit 90%igem Alkohol mischt, eine vorherige Behandlung der Schnitte mit einem Intermedium also nicht notwendig ist. Karmin- und Hämatoxylinfärbungen sind in diesem Einschlußmittel gut haltbar; Teerfarben verblassen mit der Zeit.

Dammarharz (Harz einer auf den Molukken heimischen Konifere, *Dammara orientalis*) ist wie Kanadabalsam in Xylol gelöst; die Schnitte müssen daher vor dem Einschluß über Xylol geführt werden.

Der Einbettungsvorgang selbst verläuft genau so, wie es bei den wässerigen Einschlußmitteln schon beschrieben worden ist. Das Harz darf in nicht zu großer Menge (1 bis 3 Tropfen) auf die Schnitte gebracht werden und beim Anpressen des Deckglases ist die überschüssige, unter den Deckglasrändern austretende Flüssigkeit sofort mit einem weichen Läppchen zu entfernen. Etwaige vorhandene Luftblasen verschwinden beim Trocknen von selbst. An staubfreiem Ort aufbewahrt, wird das Trocknen in 8 Tagen beendet sein und die fertigen Präparate können dann ohne Randverschluß aufbewahrt werden. Die Reinigung der Deckgläser und Objektträger von etwa anhaftendem trokkenen Harz erfolgt mit einem feinen, mit Xylol getränktem Läppchen.

Faßt man die Einbettung in Harze und Balsam in einer Tabelle zusammen, so ergeben sich folgende Möglichkeiten der Bearbeitung:

Die Objekte befinden sich in			Einschlußmittel
70—80%igem Alkohol	→ Nelkenöl →	Xylol →	Kanadabalsam oder Dammarharz
87—90%igem Alkohol	→ Terpineol →		
96%igem Alkohol	→ Xylol-Alkohol →	Xylol →	
	→ Zedernholzöl →		
90%igem Alkohol	→		Venetianer Terpentin

II. Einführung in die Pflanzenanatomie

16. Form und Inhalt der Zellen

Die einfachsten Bausteine der Pflanzen sind die Zellen, die in ihrer Gesamtheit den pflanzlichen Organismus aufbauen und durch ihre Tätigkeit erhalten. Sie nehmen die verschiedensten Formen an, sind jedoch immer kleine Kämmerchen, die einen lebenden Inhalt führen oder ihn im Laufe der Entwicklung aufgegeben haben. Gegenüber

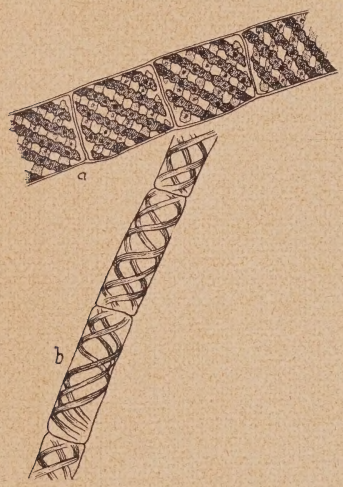


Abb. 20. Verschieden lange Zellfäden der Schraubenalge (*Spirogyra*)

den tierischen Zellen werden die Wände aus besonderen Häuten gebildet und sie umschließen den Zelleib oder Protoplasten.

Von einer gekochten Kartoffelknolle nehmen wir ein wenig mit der Lanzettnadel ab, fügen einen Tropfen Wasser hinzu und stellen ein Quetschpräparat (Deckglas leicht gegen den Objektträger drücken) her. Unter dem Mikroskop zeigen sich kleine kreisförmige Flächen, und beim Hoch- und Niederschrauben des Tubus können wir feststellen, daß es sich nicht um flächige Gebilde, sondern um Körper handelt, die die Form von Bläschen haben. Der Inhalt ist gleichmäßig grau granuliert. Diese Gebilde sind die Zellen der Kartoffelknolle.

In gleicher Weise stellen wir ein Präparat von der Schuppe des Sauerklees her. Der Sauerklee (*Oxalis acetosella*) liebt den Waldesschatten und an seinem unterirdischen Stengel finden sich dickfleischige Schuppen. Man löst eine Schuppe ab, schabt sie mit der Nadel auf einen Objektträger aus und zerfasert den Inhalt. Es zeigen sich Zellen, die denen von der Kartoffel recht ähnlich sind.

Manche Pflanzen bestehen nur aus einer Zelle und sie zeigen z. T. sehr hübsche Formen. Aus dem Aquarium entnehmen wir ein Büschel von Fadenalgen und schwenken sie in einer kleinen Schale mit Wasser aus. Das Wasser bleibt einige Zeit an einem sonnigen Fenster stehen und die darin enthaltenen Zieralgen (Desmidiaceen) werden nach der Lichtseite hinwandern. An dieser Stelle wird ein Tropfen Wasser mit der Pipette aufgesogen, auf den Objektträger übertragen und mit einem Deckglase bedeckt. Sind Zieralgen darin enthalten, so zeigen sich diese als kleine halbmond- oder scheibenförmige grüne Zellen. Wenn keine Zieralgen vorhanden sein sollten, dann werden sich aber immer die starren und hübschen Kieselalgen (Diatomeen) finden.

Auch der Blütenstaub der Pflanzen wird aus einzelnen Zellen gebildet und wegen der leichten Beobachtungsmöglichkeit fertigen wir ein Wasserdeckglaspräparat an. Der Pollen wird mit einem Pinsel von den Staubbeuteln abgenommen und in Wasser übertragen. Je nach den vorhandenen blühenden Pflanzen wird sich der Pollen in den verschiedenen Ausbildungsformen zeigen. Meistens sind es kugelige Zellen mit Stacheln, Leisten oder Randbläschen.

Bevor wir uns mit dem Inhalt der Zellen beschäftigen, müssen wir noch an einigen Präparaten ihre Gestalt kennen lernen; die Objekte werden immer in Wassereinschluß untersucht. Langgestreckte, zylindrische Zellen zeigen die fadenförmigen Süßwasseralgen (z. B. die Schraubenalge [*Spirogyra*]). Die Zellen hängen immer mit den Schmalseiten aneinander und bilden so einen einfachen fädigen Pflanzenkörper (Abb. 20). — Bei den Staubfädenhaaren der Tradescantiablüte finden wir auch wieder einen Zellfaden, doch sind die einzelnen Zellen von kugelförmiger Gestalt und erscheinen perlschnurartig aneinander gereiht. — Die Samenfäden der Weide (*Salix*) und der Baumwolle (*Gossypium*) werden aus langgestreckten, bandförmigen und gedrehten Zellen gebildet. — Rechteckige Zellen bauen das Blatt der Wasserpest (*Elodea canadensis*) auf.

Das abgezupfte Blättchen (möglichst von einer Knospe) wird ganz unter das Deckglas gebracht und beobachtet. Es kommt hier nur auf die Form und nicht auf den Inhalt der Zellen an. — Das Blatt einer Schwertlilie (*Iris*) einritzen und die feine Oberhaut abziehen. Die Zellen sind sehr stark in die Länge gezogene Sechsecke. — Meistens haben aber die Oberhautzellen der Blätter und Blüten wellig gebogene Zellwände. Die Blattoberhaut vom Mauerpfeffer (*Sedum acre*) oder von der Fuchsie (*Fuchsia hybrida*) abziehen und beobachten. Die Zellwände sind wellig verbogen, greifen aber fest ineinander. — Durch den Stengel einer Binse (*Juncus*) fertigen wir einen feinen Querschnitt an und entfernen den äußeren grünen Ring. Die Zellen sind sternförmig, liegen aber nicht fest aneinander; zwischen den einzelnen Zellen bleiben immer große Räume leer und diese werden als Interzellularräume bezeichnet. Bei Safraninfärbung treten die Zellen klar hervor (Abb. 21).

Abb. 21. Mark der Binse (*Juncus*), quer. Sternzellen und Interzellularräume

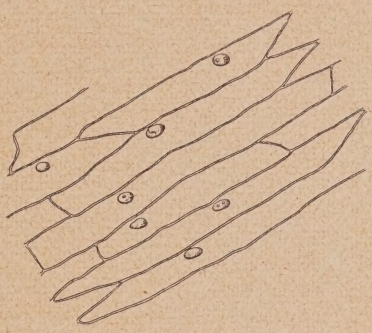


Abb. 22. Zwiebelschale mit langgestreckten Zellen bei stärkerer Vergrößerung

Abb. 23. Blatt des Wettermooses mit Chlorophyllkörnern angefüllt

Eine gewöhnliche Zwiebel wird bis zur weißen „Zwiebelschale" entschält. An diesen fleischigen Schalen findet sich an der Innenseite die Oberhaut meistens schon abgelöst vor und mit der Pinzette wird ein kleines Stück eines solchen Häutchens entnommen und in Wassereinschluß untersucht. Die Zellen sind sehr langgestreckt, von wenig regelmäßiger Gestalt und fest verwachsen (Abb. 22). Sie sind erfüllt vom Zellplasma und in diesem liegt der Zellkern. Zur besseren Sichtbarmachung fügen wir Chlorzinkjodlösung hinzu. Das Plasma wird dadurch abgetötet, zieht sich etwas von der Zellwand zurück und schon nach kurzer Einwirkungszeit tritt der Zellkern deutlich gefärbt hervor, während das Plasma nur leicht getönt ist. Die Kerne sind sehr reich an Chromatin und da dieses sich gerne mit anderen Farbstoffen verbindet, so können wir durch Zufügung von Safranin eine noch stärkere Kernfärbung erreichen.

Die grüne Farbe der Pflanzen rührt her von Farbstoffträgern (Chromatophoren), die im Plasma der Pflanzenteile liegen, die dem Licht ausgesetzt sind. Wir betrachten zuerst die Träger des grünen Farbstoffes, die Chlorophyllkörner; es sind abgeflachte, ellipsoidische Körner, platten- oder bandförmige Gebilde. Vom Wettermoos (*Funaria hygrometrica*) wird ein Blättchen abgezupft und in Wassereinschluß beobachtet. Das Blatt besteht aus fest miteinander verwachsenen Zellen und besonders die nach der Spitze und der Mitte zu gelegenen Zellen erscheinen mit Chlorophyllkörnern angefüllt (Abb. 23).

In den Zellen der Schraubenalge findet sich das Blattgrün als gewundenes Band (s. Abb. 20). Hier muß nochmals auf den verhältnismäßig gut sichtbaren Zellkern geachtet werden, der als linsenförmiger, stark lichtbrechender Körper in der Mitte der Zellen aufgehängt erscheint.

Durch die fast reife Frucht einer wilden Rose (Hagebutte) stellen wir einen feinen Schnitt her, der das Fleisch dicht unter der Schale gut trifft. In den Zellen finden sich verschieden gestaltete gelblich rote Körperchen, Farbkörperchen, die den Früchten die leuchtende Farbe verleihen. — Auch die Zellen der Tomaten und Möhren enthalten diesen Farbstoff. —

Durch die Lageveränderungen der Teilchen zeigt sich uns das Plasma als lebende Substanz. Diese Protoplasmaströmung kann in zwei verschiedenen Formen auftreten: in der Rotation und Zirkulation. Die Rotation findet sich meistens bei den Wasserpflanzen (*Elodea, Vallisneria, Nitella*). Das Plasma bewegt sich langsam an den Wänden der langgestreckten Zellen in einer Richtung vorwärts und schließt einen Stromkreis, der

in sich selbst zurückkehrt. An einem abgezupften Blättchen der Wasserpest (*Elodea canadensis*) ist die Rotation meistens gut zu beobachten. Durch das Abreißen wird ein Wundreiz hervorgerufen, der die Plasmabewegung stark beeinflußt. Ist keine Bewegung zu beobachten, so erwärme man gelinde über einer Spiritusflamme. — Die Zirkulation findet sich nicht nur im plasmatischen Wandbelag der Zellen, sondern sie geht auch über auf die mannigfachen Bänder und Stränge, die die Zellen der Landpflanzen quer durchsetzen. Die Bewegungsrichtung ist innerhalb einer Zelle nicht gleichsinnig und entgegengesetzte Bewegungen sind zu beobachten. Ein günstiges Objekt für diese Beobachtung sind die Staubfadenhaare von *Tradescantia*, die in Wassereinschluß untersucht werden.

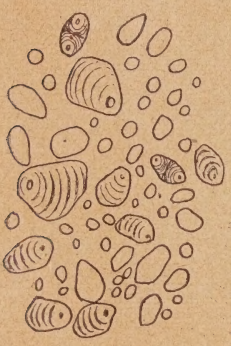


Abb. 24. Kartoffelstärke

Abb. 25. Bohnenstärke, bei *a* = stärker vergrößert, *b* = rissiges Stärkekorn

Die Stärke gehört zu den wichtigsten Zellinhaltsstoffen und an einem Schnitt durch eine Kartoffel wollen wir die Verhältnisse genauer betrachten. Mit dem Taschenmesser wird ein geeignetes Stück herausgeschnitten und jetzt in beliebiger Richtung mit dem Rasiermesser fein geschnitten. Man sieht ein ganz gleichmäßig gebautes Grundgewebe, dessen dünnwandige Zellen von Stärkekörnern vollgestopft sind (Abb. 24). Größe und Form der Stärkekörner sind sehr verschieden, doch zeigen sie in ihrem Bau das einheitlich durchgängige Merkmal der exzentrischen Anordnung der einzelnen Schichten. Durch Bewegung des Deckglases überzeugen wir uns davon, daß es sich nicht um scheibenförmige, sondern um ellipsoidische Gebilde handelt; sie „rollen" unter dem Deckglas. — Bei mittlerer Vergrößerung fügen wir vom Rande des Deckglases dem Präparat Jodlösung hinzu und saugen von der anderen Seite das Wasser mit Fließpapier ab. Die Körner färben sich erst blau und später violett. Zu einem anderen Präparat fügen wir statt der Jodlösung Kalilauge und bemerken nun, daß die Körner sehr stark aufquellen, ihre Schichtung verlieren und schließlich unsichtbar werden. Durch Zugeben von Wasser kann die Kalilauge wieder ausgewaschen werden und nachdem Jodlösung im Überschuß zugefügt worden ist, treten die Stärkekörner in hellblauer Farbe hervor. Durch die Kalilauge ist nur ein Verquellen eingetreten; die gleiche Wirkung bringt der Zusatz von heißem Wasser hervor, es erfolgt Kleisterbildung.

Von einer Bohne schaben wir aus dem Innern etwas mit dem Messer ab, übertragen es in Glyzerin und fertigen das Präparat an. Man erkennt sofort Zellen mit Stärkekörnern und frei gewordene Stärkekörner von ovaler Gestalt (Abb. 25). Die Form dieser Stärkekörner ändert sich sofort bei Wasserzusatz: sie werden im Innern rissig aussehen und zeigen damit die für Bohnenstärke charakteristische Struktur. — Reaktion mit Jod und Kalilauge ausführen!

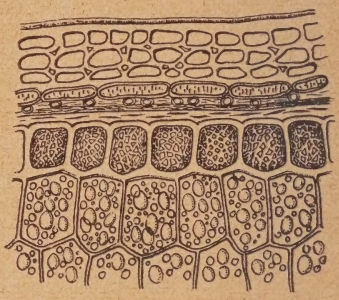


Abb. 26. Querschnitt durch ein Weizenkorn

Wir schneiden ein Weizenkorn mit dem Taschenmesser quer und klemmen die Hälfte zwischen Holundermark ein. Mit dem Rasiermesser werden feine Schnitte so hergestellt, daß auch die Schale mitgeschnitten wird. Die Querschnitte (Abb. 26) zeigen uns am Rande die etwas zusammengepreßten Zellen der Samenschale und darauf nach innen eine Schicht Zellen von quadratischem Aussehen, die mit Körnchen gefüllt sind. Die auf diese Schicht folgenden Zellen sind größer und in ihrer Längserstreckung senkrecht zur Oberfläche gestellt. Die Jodreaktion zeigt deutlich die Verteilung der Inhaltsstoffe. Die Körnchen in den inneren Zellen bläuen sich sofort und erweisen sich damit als Stärkekörner. Die in den quadratischen Zellen gelegenen Körnchen werden

durch das Jod nur gelbbraun gefärbt, sie werden Aleuronkörner genannt.

Daß Stärkekörner und Aleuronkörner Reservematerial des Pflanzensamens sind, soll das folgende Präparat zeigen. Zwischen

Abb. 27. Korrodierte Stärkekörner. *B* u. *C* = stärker vergrößert

feuchtem Fließpapier bringen wir mehrere Weizenkörner zum Keimen. Nachdem die Keimwurzeln vorhanden sind, reißen wir diese ab und quetschen das Korn in einem Tropfen Wasser aus. Der Tropfen wird auf den Objektträger übertragen und mit einem Deckglas bedeckt. Die Trübung des Wassers rührt von der Stärke her, und die Beobachtung zeigt, daß die Stärkekörner zum Teil ihre alte Struktur verloren haben (Abb. 27). Streifen und Risse sind aufgetreten und Auflösungserscheinungen sind an vielen Stellen deutlich sichtbar: die Stärkekörner sind korrodiert. Sie werden nämlich während des Keimungsprozesses gebraucht und abgebaut.

Das Inulin ist chemisch der Stärke sehr nahe verwandt; es wird bei richtiger Vorbehandlung in den Zellen der Georginenknollen gut sichtbar. Aus Georginenknollen fertigen wir einige Längsschnitte und stellen fest, daß die Knollen aus einem Gewebe von

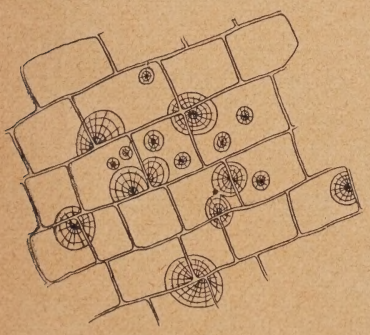


Abb. 28. Inulin

rechteckigen Zellen bestehen, die scheinbar leer sind. Einen weiteren Schnitt machen wir von Alkoholmaterial. Die Schnittfläche (Objekt in Holundermark einklemmen!) wird mit Glyzerin befeuchtet und die Schnitte werden in Glyzerineinschluß untersucht. Das Plasma ist durch die Vorbehandlung abgetötet worden. An den Zellwänden beobachten wir jetzt mehr oder weniger vollständige kreisförmige Ausscheidungen, die wie Radien von einem Mittelpunkt ausstrahlen: das Inulin (Abb. 28). Dieses ist nämlich im Zellsaft gelöst und erst durch den Alkohol zum Auskristallisieren veranlaßt worden. Wird das Glyzerin durch Wasser verdrängt, so lösen sich die Kristalle (Sphärokristalle) auf; die gleichen Wirkungen bringen auch Kalilauge und Salzsäure hervor.

Im Plasma treten Kristalle als Endprodukte des Stoffwechsels in mannigfacher Form auf. Vom Blatt der Meerzwiebel (*Scilla maritima*) brechen wir die Spitze ab und untersuchen den austretenden schleimigen Tropfen. Es sind große, von beiden Enden zugespitzte Nadeln von oxalsaurem Kalk darin enthalten (Rhaphiden genannt, Abb. 29). In den Zellen der trockenen Schalen der Meerzwiebel kann man die Kristalle in ungestörter Lagerung beobachten. Die Schale wird in Alkohol luftfrei gemacht und in Wassereinschluß untersucht.

Abb. 30. Rhaphidenbündel

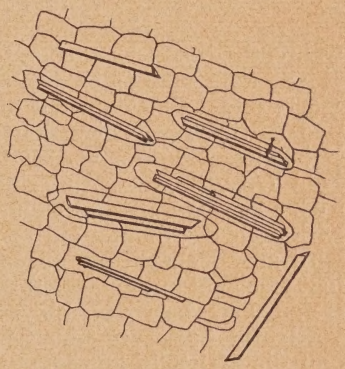


Abb. 31. Rhaphiden-Zwillinge

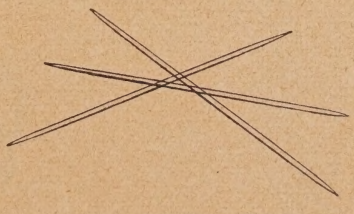


Abb. 29. Rhaphiden-Nadeln

Sehr einfach gestaltet sich die Untersuchung bei der Wasserlinse (*Lemna trisulca*), die ohne jede Präparation auf den Objektträger gebracht wird (Abb. 30). — Während in den bisher angefertigten Präparaten immer ganze Bündel von Kristallen zu beobachten waren, findet man auf Schnitten durch den Wurzelstock der Schwertlilie (Iris) immer nur Einzel- und Doppelkristalle (Zwillinge) (Abb. 31). Sie haben lange prismatische Gestalt und es hat den An-

schein, als ob sie zwischen den Zellen lägen; in Wirklichkeit sind sie aber in besonders großen Zellen deponiert, die sich zwischen die kleineren Zellen einschieben. — Schon vorher wurde gesagt, daß die Kristalle Endprodukte des Stoffwechsels seien und das tritt deutlich hervor, wenn man

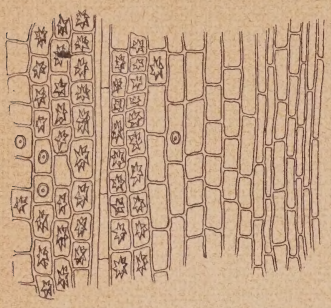


Abb. 32. Kristalldrusen im Kastanienblatt

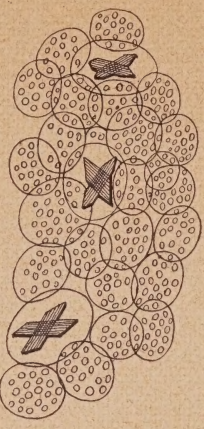


Abb. 33. Zwiebelschale mit Kristallen

während des herbstlichen Laubfalles die Kastanienblätter untersucht. Auf Quer- und Längsschnitten durch Blattstiele und Mittelrippen der Blätter finden sich Kristalle in Form von Drusen in großer Zahl (Abb. 32). — Aus einer Zwiebelschale wird die Luft durch Alkoholeinwirkung entfernt und ein kleines Stückchen wird zur Beobachtung abgezupft. Das Objekt erscheint gut aufgehellt und die Kristalle treten klar hervor (Abb. 33). Wir setzen vorsichtig Salzsäure hinzu und sehen nun, daß die Kristalle langsam vom Rande her gelöst werden; es entsteht Chlorkalzium. Nach längerer Einwirkungszeit sind die Kristalle vollständig verschwunden. Nimmt man statt der Salzsäure ein wenig verdünnte Schwefelsäure, so bildet sich schwefelsaurer Kalk (Gips), eine recht wenig lösliche Verbindung, die sofort nach der Bildung wieder auskristallisiert. Der Gang der Umwandlung ist unter dem Mikroskop gut zu beobachten und geht so vor sich, daß die Kristalle verschwinden und an ihrer Stelle feine Nadeln auftreten (Gipsnadeln), die dauernd an Größe zunehmen, so lange noch lösliche Kristalle von oxalsaurem Kalk vorhanden sind.

17. Die Zellmembran

Die Zellmembran wird vom Protoplasten ausgeschieden. Zellen, die nicht mit einer Zellhaut umgeben sind, treten recht selten im Pflanzenreich auf. Die Zellmembran dient vor allen Dingen zum Schutze der Protoplasten und zur Erhöhung der Festigkeit. Das Flächenwachstum der Zellmembran erfolgt durch Dehnung oder durch Einlagerung (Intussuszeption) von neuer Substanz in entstehende Zwischenräume. Das Dickenwachstum bedingt die verschiedensten Ausbildungsformen und an einigen wenigen Beispielen sollen verschiedene Formen gezeigt werden.

Bei vielen Pollen und Sporen zeigen sich die Verdickungen der Zellmembran als vorspringende Spitzen, Stacheln und Leisten. In Wassereinschluß betrachten wir den Pollen vom Kürbis (*Cucurbita pepo*), vom Kreuzkraut (*Senecio spec.*), von der Kohl-Kratzdistel (*Cirsium oleraceum*, Abb. 34) oder die Sporen vom Engelsüß (*Polypodium vulgare*) und vom Wurmfarn (*Aspidium filix mas*, Abb. 35).

Diese bei den Pollen und Sporen zu beobachtenden Wandverdickungen sitzen der Zellhaut immer außen auf und werden als zentrifugale Verdickungen von den zentripetalen getrennt. Hier können wir gleich eine eigenartige zentripetale

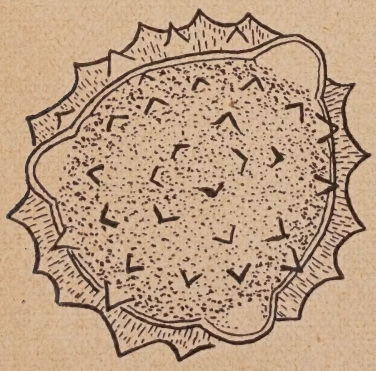


Abb. 34. Pollen von *Cirsium oleraceum*. Nach Meinke

Abb. 35. Spore von *Aspidium filix mas*. Nach Meinke

Wandverdickung kennen lernen, die auf einen kleinen Raum beschränkt eine ganz interessante Form angenommen hat. Die Blätter des Gummibaums (*Ficus elasticus*) werden quer geschnitten und in

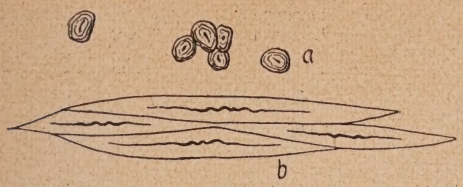


Abb. 36. Gewürznelke. *a* = quer und *b* = längs geschnitten

Wassereinschluß beobachtet. Die Epidermis ist hier dreischichtig und in einem geeigneten Schnitt können wir kleine, traubenartige Gebilde beobachten, die an einem Stiel in einen Hohlraum des Blattgewebes hinabhängen. Es sind dies die sogenannten Zystoliten, die mit Kieselsäure und mit kohlensaurem Kalk stark inkrustiert sind. Wir lassen konzentrierte Salzsäure vom Rande des Deckglases her zutreten und beobachten die Lösung des kohlensauren Kalkes, die unter Bläschenentwicklung vor sich geht.

Quer- und Längsschnitte durch eine Gewürznelke zeigen uns Zellen, die fast ohne Lumen sind (Abb. 36). Die Wandverdickung durch Anlagerung neuer Lamellen geht hier so weit, daß der Zellhohlraum verdrängt wird. Die Schnitte quellen im Wasser schnell auf und die Färbung mit Safranin gelingt sehr leicht.

Die Verdickung der Zellwand kann aber auch an einzelnen Stellen unterbleiben und

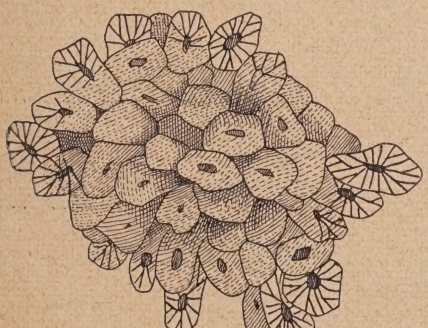


Abb. 37. Steinzellen-„Nester" aus dem Fruchtfleisch der Birne

es bilden sich dann zwischen stark verdickten Teilen einzelne Kanäle, die als Tüpfelkanäle bezeichnet werden. Diese Verhältnisse können wir an feinen Querschnitten durch die Schale der Walnuß oder an Aprikosenkernen beobachten. Die Zellen sind fast ohne Lumen und von dem inneren Hohlraum ziehen sich durch die schalenartig aufgebaute starke Zellwand einzelne Kanäle hindurch. Die scheinbar

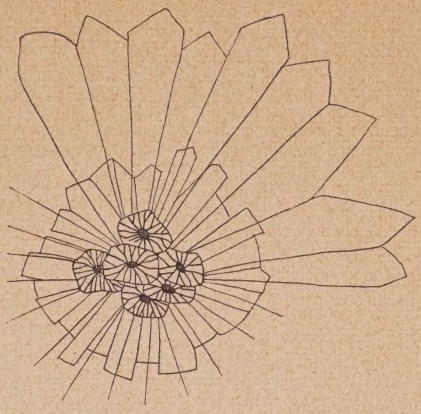


Abb. 38. Struktur der Steinzellen aus dem Fruchtfleisch der Birne

blind endigenden Tüpfelkanäle sind schräg angeschnitten und verlaufen nicht in der Schnittebene.

Ähnliche Steinzellen enthält auch das Fruchtfleisch der Birne (*Pirus communis*). Sie finden sich als Nester (Abb. 37) zwischen den dünnwandigen Parenchymzellen und fallen im Präparat sofort auf. Die Zellwände sind sehr stark verdickt, von Tüpfelkanälen reichlich durchsetzt und das Lumen enthält keinen lebenden Inhalt mehr. Bei der Anwendung von Chlorzinkjodlösung tritt die Struktur klar hervor und man beachte besonders das Aneinanderstoßen der

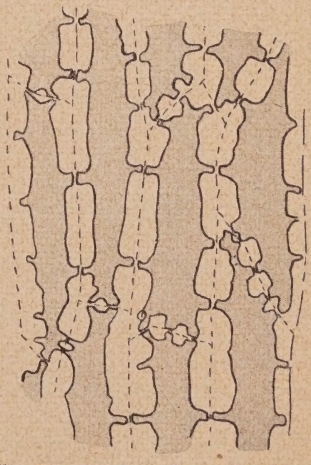


Abb. 39. Zellen aus dem Dattelkern. Die Membranen sind weiß, der Zellinhalt getönt, die primären Zellwände deutet die gestrichelte Linie an. Etwas schemat. nach Möbius

Steinzellen (Abb. 38). An der Berührungsfläche passen die die Steinzellen durchsetzenden Tüpfelkanäle genau aufeinander

und die Kenntnis dieser Erscheinung ist wichtig für das Verständnis der Funktion der Tüpfelkanäle. — Tangentialschnitte durch die Schale der Haselnuß (*Corylus avellana*), des Kirschkerns (*Prunus avium*), und Querschnitte durch die Verdickungsleisten einer Paranußschale (*Bertholletia*) zeigen ganz ähnliche Bilder.

Abb. 40. Zellen aus einem Ästchen der Lärche, quer

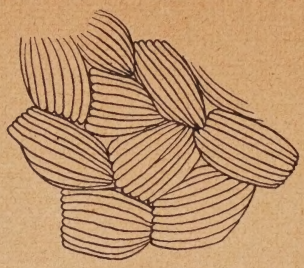


Abb. 41. Sklerenchymfasern aus der Johannisbeere

Die Funktion der Tüpfelkanäle und der Tüpfel wird uns klar an einem Längsschnitt durch den Dattelkern. Mit dem Taschenmesser spalten wir einen Kern in der Längsrichtung auf und stellen uns mit dem Rasiermesser eine gute Schnittfläche her. Zur besseren Sichtbarmachung des Zellinhaltes fügen wir dem Präparat einen Tropfen Jodlösung hinzu. Der Zellinhalt färbt sich leicht gelb und die Zellen erscheinen jetzt als mit Fortsätzen versehen. Die Zellen sind nur an bestimmten Stellen verdickt und die Verbindung zwischen den benachbarten Zellen wird durch die Tüpfel hergestellt (Abb. 39). Sie werden nur getrennt durch die Schließhäute der Tüpfel und es ist jetzt klar, daß diese Tüpfel oder Poren Verbindungswege zwischen den benachbarten Zellen darstellen. — Die Plasmafärbung (24 Stunden) mit Methylviolett soll nach Möbius gut gelingen.

Eigenartig geformte Zellen zeigen sich auf den Querschnitten durch junge Äste der Lärche (*Larix*). Im Rindenteil liegen stark verästelte, unregelmäßig gebaute Zellen, deren Wände stark verdickt sind. Bei Safraninzusatz tritt die Schichtung deutlich hervor (Abb. 40).

Kurz hinzuweisen wäre hier noch auf die Einlagerung bestimmter Stoffe in die Zellwände. Kieselsäure als Einlagerungssubstanz findet sich bei verschiedenen Pflanzen. Die Diatomeen sollen hier wegen der schwierigen Präparationstechnik nicht behandelt werden. Die Hauptsprosse des Schachtelhalms bieten ein günstiges Objekt. Der Nachweis der Kieselsäure kann durch Glühen der betreffenden Teile erfolgen, doch ist der mikroskopische Nachweis einfacher. Es ist nur notwendig, das Objekt in einem Medium zu untersuchen, dessen Brechungsexponent von dem der Kieselsäure abweicht, z. B. Phenol, Chloralhydrat, Benzol, Monobromnaphthalin oder Eugenol. Durch den Brechungsunterschied der Lichtstrahlen erscheinen dann die verschiedenen Teile der Pflanze in rötlichem oder bläulichem Glanz.

Bei den Armleuchtergewächsen (Characeen) finden sich starke Inkrustationen von kohlensaurem Kalk. In Wassereinschluß erscheinen die Ästchen fast schwarz und undurchsichtig und erst nach Zusatz von Salzsäure löst sich der Kalk auf und das Präparat wird durchsichtiger.

18. Zellgewebe (Festigungs- und Leitgewebe)

Die im vorhergehenden Abschnitt besprochenen Membranverdickungen treten nun in bestimmten Zellen in regelmäßiger Anordnung auf und erst durch diese Verdikkungen erhält die Pflanze eine gewisse Festigkeit. Der Hinweis auf den Roggenhalm mag schon genügen, um zu zeigen, ein wie hohes Maß von Festigkeit vorhanden ist, denn bei geringem Querschnitt und bedeutender Länge vermag der Halm dem Winde zu trotzen. Die Gesamtheit der bei den Pflanzen bekannten Festigungsgewebe bezeichnen wir als Stereome.

Das Sklerenchym ist ein Festigungsgewebe, das nur in ausgewachsenen Pflanzenteilen auftritt. Wir unterscheiden Sklerenchymzellen und Sklerenchymfasern (Bast). Mit der Lanzette entnehmen wir der Frucht der Johannisbeere (*Ribes rubrum*) etwas Fruchtfleisch und fertigen ein Wasserquetschpräparat an (Abb. 41). Die Sklerenchymfasern liegen zu mehreren parallel gestreckt und bilden feine Häutchen, die von den benachbarten Lagen

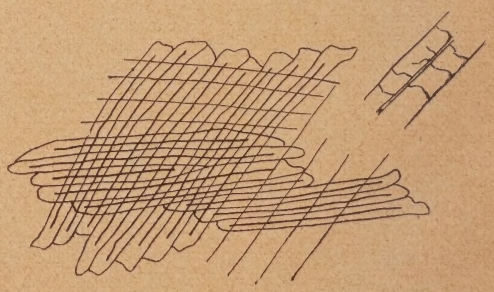


Abb. 42. Zellen aus dem Kernhaus des Apfels

durch ihre Richtung immer abweichen. Die Zellen sind ohne Lumen (d. h. ohne freien Innenraum). — Aus dem Kerngehäuse des Apfels wird die hornige Haut herausgelöst und quer und in der Fläche geschnitten. Die Haut besteht aus dicht zusammenliegenden langgestreckten Zellen, deren Wände vollständig verdickt sind.

Abb. 43. Ring- und Schraubengefäße aus angefaultem Gurkenfleisch

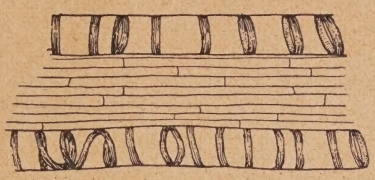


Abb. 44. Ringtracheiden aus Schilf

Die übereinanderliegenden beiden Schichten zeigen ganz verschiedenen Verlauf der Sklerenchymzellen und die Festigkeit wird durch diese Anordnung bedeutend erhöht (Abb. 42). — Die Sklerenchymfasern treten besonders in den Gespinstpflanzen auf und können hier Längen von 2—40 mm erreichen.

Es wurde schon gesagt, daß das Sklerenchym nur in ausgewachsenen Pflanzenteilen auftritt und in solchen Teilen fehlt, die sich noch im Streckungswachstum befinden. Anders beim Kollenchym. Die Kollenchymzellen enthalten noch Plasma und der Transport der Stoffe erfolgt bei ihnen durch vorhandene Tüpfel. Der Blattstiel der Rübe (*Beta vulgaris*) wird zwischen Holundermark quer geschnitten, und zwar orientieren wir den Stengel so, daß die vorgewölbte Unterseite zuerst getroffen wird. Das Kollenchym zieht sich unter der Epidermis hin und die Verdickungen der Zellen erscheinen als Dreiecke. Die ursprünglichen Zellwände treten beim Heben und Senken des Tubus als dunkles Kreuz in den Verdickungen hervor. Die Bildung dieses Festigungsgewebes geht von den zusammenstoßenden Ecken aus.

Die Gefäße und Siebröhren dienen den Pflanzen zur schnellen Weiterleitung der Baustoffe, sie bilden ein ganzes System und werden als Leitgewebe zusammengefaßt. Die Gefäße sind dadurch entstanden, daß in Längsreihen von Zellen die Zellwände allmählich resorbiert worden sind; nach ihrem Bau werden sie in Tracheen und Tracheiden aufgeteilt. Während die letzteren als Einzelzellen besonders in jüngeren Geweben erscheinen, bilden die ersteren lange Röhren und gehören dem älteren Gewebe an. — Je nach den Wandverdickungen unterscheiden wir zwischen Ring-, Schrauben- und Netztracheen oder -tracheiden. Ring- und Schraubengefäße lassen sich gut in angefaultem Gurkenfleisch beobachten (Abb. 43). Von dem Material wird ein Wasserquetschpräparat hergestellt. Die Wände dieser Gefäße sind außerordentlich zart und es hat den Anschein, als ob sie nur durch die Ringe gestützt und offen gehalten würden. Besser sind diese Elemente des Leitgewebes in angefaulten Stengelstücken vom Schilf (*Phragmites communis*) zu sehen (Abb. 44). Die Zellwände sind stärker und die Ringe liegen in mehr oder weniger regelmäßigen Abständen voneinander.

Längsschnitte durch Stengelstücke der Zaunrübe (*Bryonia*) vermitteln uns ein Bild der Netzgefäße (Abb. 45). Auch in den älteren Stengelteilen des Kürbis (Radialschnitte ausführen!) zeigen sich die Netzgefäße.

Die Verdickung der Zellwand kann so weit gehen, daß nur spaltenförmige Tüpfel zwischen den verdickten Teilen übrig bleiben. Die Gefäße werden Treppen- oder Leitergefäße genannt. Wir führen Längsschnitte durch den Wurzelstock (Rhizom) vom Adlerfarn (*Pteridium aquilinum*) aus und erhalten das Bild der Treppengefäße, wie es Abb. 46 zeigt.

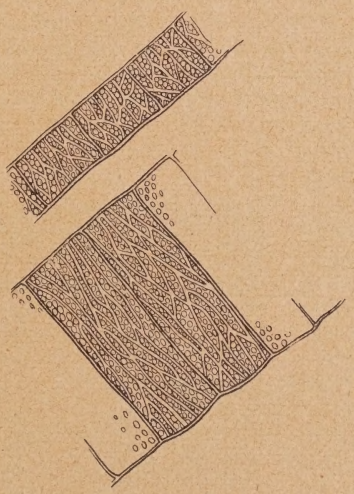


Abb. 45. Netzgefäße aus dem Stengel einer Zaunrübe

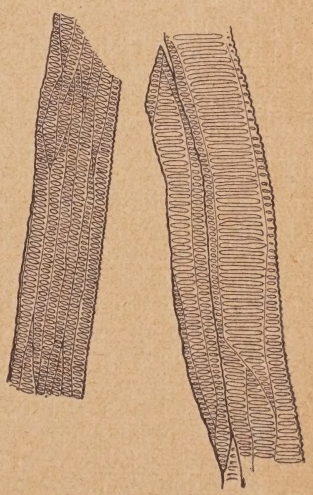


Abb. 46. Treppengefäße aus dem Wurzelstock eines Adlerfarns

Zum Studium der Siebröhren verwenden wir Stengelstücke vom Kürbis, die etwa 1 m von der Sproßspitze entfernt genommen werden. Das Material muß gut schnittfest sein und es wird deshalb vor der Verarbeitung in Alkohol gehärtet. Auf Längsschnitten haben wir das ganze Leitgewebe vor uns und suchen nun solche Stellen auf, die der Aussenseite, d. h. der Oberhaut des Stengels, zugekehrt sind. Die Siebröhren stellen auch lange Zellreihen dar, doch sind die Zwischenwände nicht aufgelöst (Abb. 47). An den Stellen dieser Unterbrechungen kann man bei stärkerer Vergrößerung durchlöcherte Platten, Siebplatten, beobachten. Die in diesen Siebröhren geleiteten Eiweißstoffe werden durch die Siebplatten von Zelle zu Zelle transportiert. Zur Beobachtung muß der Schnitt genügend dünn geführt sein und eine hinlänglich starke Vergrößerung zur Anwendung kommen.

Abb. 47. Siebröhren aus dem Stengel eines Kürbis

In den Milchröhren ist der Zellinhalt fast verschwunden; er findet sich nur als Wandbelag und der vorhandene große Hohlraum wird erfüllt von einem milchigen Saft. Die Querwände dieser Milchröhren sind resorbiert worden und die häufig auftretenden Querverbindungen sind genau so zu erklären. Das Untersuchungsmaterial (Löwenzahn, Schöllkraut oder Schwarzwurzel) muß vor dem Schneiden in Alkohol eingelegt werden, damit der Milchsaft gerinnt und im Präparat besser sichtbar wird. An Rasiermesserschnitten kann man in großen Zügen den Verlauf der Milchröhren beobachten; sie heben sich durch die bräunliche Farbe des Saftes deutlich aus dem umgebenden Gewebe heraus (Abb. 48).

1º. Oberhautgebilde

An Blättern, Stengeln und Blüten der Pflanzen finden wir Haare verschiedenster Art und es kann hier nur eine ganz kleine Auswahl von Objekten beschrieben werden. Die Präparation ist ganz einfach: mit einem Skalpell oder einer Pinzette oder dem Rasiermesser nimmt man das Haar vom Pflanzenteil ab und untersucht es in Wassereinschluß (Abb. 49).

An den Blättern der Kornrade (*Agrostemma githago*) finden wir sehr lange Haare, die mit einer Pinzette tief an der Basis angefaßt abgezupft werden. Während die Haare selbst einfach und fünf- bis sechszellig sind und an der Spitze lang ausgezogene Zellen aufweisen, sind die Basiszellen sehr kurz, verbreitert und von einem Kranz kleiner Zellen umgeben. Das Innere der Haarzellen ist mit Luft erfüllt, die im Präparat meistens durch das Wasser verdrängt wird. Die Basiszellen enthalten noch Plasma und der Nachweis kann durch Glyzerinzusatz leicht erbracht werden. Wir bringen an den Rand des Deckgläschens einen Tropfen Glyzerin und saugen an der anderen Seite das Wasser mit Fließpapier ab. Die Basiszellen werden plasmolysiert. — An einem Querschnitt durch das Blatt, der genau durch die unterste Basiszelle gehen muß (viele Querschnitte anfertigen!), wird beobachtet, daß die Basiszelle zu den Oberhautzellen gehört. Sie ist größer, geht tiefer als die normalen Oberhautzellen und weist eine kegelstumpfförmige Gestalt auf. Der Kegelstumpf wird von den anderen Zellen umlagert.

Die Stengel und Blätter des Goldlacks (*Cheiranthus Cheiri*) sind mit einzelligen, vielfach verzweigten Haaren bedeckt. Um

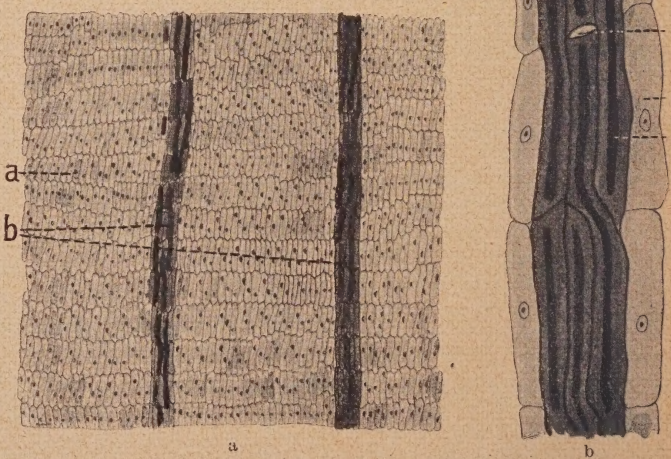


Abb. 48 a. Rindengewebe einer Wurzel vom Löwenzahn mit Milchröhren, Längsschnitt. — *a* = Parenchymgewebe. *b* = Milchröhrenstränge
Abb. 48 b. Ein Milchröhrenstrang-Längsschnitt bei stärkerer Vergrößerung. — *a* = Parenchymzelle. *b* = Milchröhren mit geronnenem, zentralen Inhalt. *c* = Aufgelöste, stoffreie Querwand. (Nach Sigmund.)

Abb. 49. Pflanzenhaare. — *a* = Haar vom Edelweiß (*Gnaphalium leontopodium*). *b* = Königskerze (*Verbascum thapsiforme*). *c* = Goldlack (*Cheiranthus cheiri*). *d* = Levkoje (*Matthiola annua*). *e* = Ananas (*Ananas sativa*). *f* = Schafgarbe (*Achillea millefolium*). *g* = Brennhaar der Nessel (*Urtica dioica*)

möglichst unbeschädigte Haare zu erhalten, fertigen wir Querschnitte durch ein Blattstückchen an. Die Anwachsstelle des Haares, das der Blattoberfläche fest angelegt ist, liegt genau in der Mitte.

Um den Übergang von den Haaren zu den Schuppen zu beobachten, rasieren wir von einem jungen Efeublatt die Haare ab. Sie sitzen auf einem kleinen Stiel und bilden einen Stern von 4—8 Zellen (Abb. 50). Weil Verwachsungen der Zellen häufig sind, erscheinen sie als Schild und vermitteln den Eindruck einer Schuppe, doch haben wir es hier noch mit Haaren zu tun.

Richtige Schuppen finden sich auf der Unterseite der Blätter der Ölweide (*Elaeagnus angustifolia*). Mit einer Lanzette schaben wir etwas von dieser silbrig glänzenden Masse ab und übertragen in Alkohol; im Wassereinschluß fängt sich außerordentlich viel Luft in den Schuppen (Abb. 51). Man sieht die ungestielten Sterne, die aus vielen radial ausstrahlenden und verwachsenen Zellen bestehen, sehr hübsch. Auch die

Abb. 50. Blatthaare vom Efeu

Schuppen gehören der Oberhaut an und ein Querschnitt durch das Blatt zeigt ein Bild, wie es Abb. 52 wiedergibt.

Aus der großen Zahl der vorhandenen vielzelligen Haare wählen wir zur Beobachtung die Samenhaare des Wollgrases (*Eriophorum*). Die Zellen bilden ganze Flächen und verjüngen sich nach oben zu, so daß die Spitze des Haares nur aus einer Zelle gebildet wird. Ähnlich erscheinen auch die Kelchhaare des Mohns (*Papaver rhoeas*). Das Haar ist gezähnelt und diese Form kommt dadurch zustande, daß eine Anlagerung der Zellen erfolgt, deren Spitzen auslaufen und nach außen leicht abgebogen sind.

Etwas eingehender soll ein Haar der Brennessel beschrieben werden. Zur Untersuchung gebrauchen wir die überall

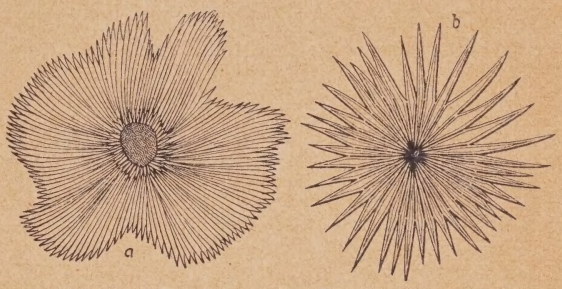


Abb. 51. Blattschuppen der Ölweide (*Elaeagnus*). *a* = gelb, *b* = weiß

häufige Brennessel *Urtica dioica*. Von jungen, in gutem Wachstum befindlichen Blättern wird mit dem Rasiermesser von der Rippe ein Haar abgeschnitten und in Wassereinschluß beobachtet. Das abgeschnittene Haar muß vollständig intakt, d. h. die Spitze darf nicht abgebrochen sein; man fertigt sich deshalb gleich mehrere Schnitte an und durchmustert diese nach brauchbaren Haaren. Ein Haar mit der noch vorhandenen Spitze zeigt Abb. 53 (s. auch Abb. 49 *g*). Das Haar ist im unteren Teil bauchartig erweitert und sitzt in einem vielzelligen Gewebe drin, das von der Epidermis des Blattes gebildet wird. Aus der Entwicklungsgeschichte des Haares wissen wir, daß es aus einer Epidermiszelle hervorgeht und es ist ja auch in ausgewachsenem Zustand einzellig. Der bauchartig anschwellende Basalteil wird während des Wachstums mit den bereits erwähnten Zellen

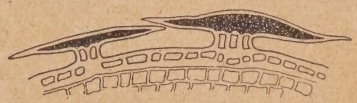


Abb. 52. Blattquerschnitt von der Ölweide

umgeben. Der Zellkern des Haares liegt ziemlich tief und ist an Plasmafäden aufgehängt. Die Spitze wird durch ein kleines Knöpfchen gebildet, das nicht in der senkrechten Verlängerung des Haares liegt,

sondern zur Seite abbiegt. Diese Anordnung des Knöpfchens bedingt beim Abbrechen durch Berührung auch ein schräges Abbrechen des Haares an der hier vorhandenen schwachen Stelle. Die Spitze des Haares erscheint also nach der Entfernung des Knöpfchens schräg abgeschnitten und kann wie eine Injektionsspritze in die Haut eindringen. Der aus der Spitze austretende Saft (Ameisensäure) ruft leichte Entzündungen hervor und verursacht beim Menschen die weißlich erscheinenden Nesselpusteln. Das Haar erhält seine Steifheit durch die Imprägnation mit Kieselsäure und kohlensaurem Kalk. Durch Zusatz von Salzsäure erfolgt unter Aufschäumen die Lösung des kohlensauren Kalkes.

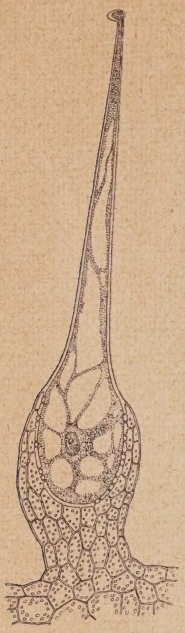


Abb. 53. Brennesselhaar

Zarte Querschnitte durch den Stengel der Zimmer-Pelargonie (*Pelargonium zonale*) vermitteln uns die Kenntnis der Drüsenhaare (Abb. 54). Sie sind recht einfach gebaut und gehen aus einer Epidermiszelle hervor, die am Grunde nicht von anderen Zellen umgeben ist. Nach dem Auswachsen der Epidermiszelle treten drei Querteilungen ein und das Köpfchen schnürt sich als besondere Endzelle ab. Aus der Endzelle, die dicht mit Plasma erfüllt ist, tritt ein klebriger Saft aus.

20. Das Blatt

Die Blätter von *Populus* sind ein sehr geeignetes Objekt, um an Querschnitten durch die Blattspreite den inneren Aufbau des Blattes kennen zu lernen. Aus dem Blatt wird ein ganz schmaler Streifen herausgeschnitten und zwischen Holundermark eingeklemmt. Mit dem Rasiermesser stellen wir viele zarte Querschnitte her, übertragen sie in Wasser und suchen unter dem Mikroskop die besten unbeschädigten Schnitte heraus (Abb. 55).

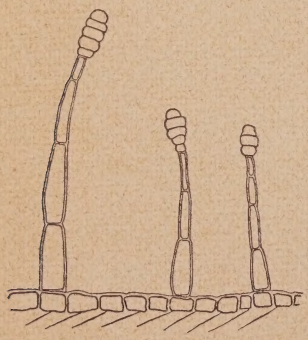


Abb. 54. Drüsenhaar von *Pelargonium*

Die Zellen der Oberseite bilden eine feste geschlossene Schicht von Zellen (Epidermis), die länger als breit sind und gegenüber den anderen zu beobachtenden Zellen starke Wände besitzen. Auch die Unterseite des Blattes wird durch eine

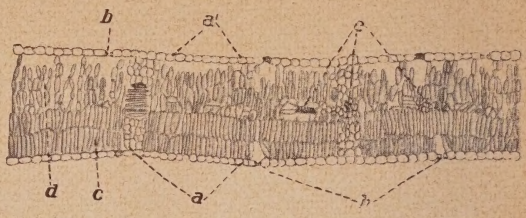


Abb. 55. Blattquerschnitt von *Populus balsamifera*. — *a* = Epidermis d. Oberseite und a^1 = der Unterseite. *b* = Spaltöffnungen. *c* = Palisadengewebe. *d* = Schwammparenchym. *e* = Gefäßbündel (Blattnerven). Nach Sigmund.

Epidermis gebildet und zwischen diesen beiden Häuten liegt das Blattgewebe (Mesophyll). Es ist nicht einheitlich gebaut, besteht vielmehr aus zwei verschieden geformten Zellkomplexen. Der Epidermis der Oberseite folgen sehr lang gestreckte zylindrische Zellen, die Palisadenzellen genannt werden. Diese Zellen vereinigen sich nach unten zu zu kleinen Gruppen und hier setzt die zweite Schicht des Blattes, das Schwammparenchym, an. Das Schwammparenchym zeigt unregelmäßig gestaltete Zellen, die zu einem Netzwerk verflochten sind und es setzt sich bis zur unteren Epidermis fort. Die untere Epidermis wird häufig unterbrochen von Öffnungen, Spaltöffnungen, die ins Innere des Blattes führen. Palisadenparenchym und Blattparenchym enthalten Chlorophyllkörner und sie bilden zusammen das Assimilationsgewebe. Zur Beobachtung der Blattnerven müssen solche Blätter ausgewählt werden, die eine Untersuchung ohne Anfertigung von Flächenschnitten zulassen. Die Blätter müssen also sehr dünn sein. Wir benützen dazu die Blätter der Weide. Mit Alkohol wird zuerst das Chlorophyll ausgezogen und gleichzeitig erfolgt die Härtung. Die Blätter werden dann in ein Aufhellungsgemisch von 8 Teilen Chloralhydrat und 5 Teilen Wasser übertragen. Die aufhellende Wirkung dieser Lösung ist so stark, daß man jeden gewünschten optischen Durchschnitt des Blattes in

Abb. 56. Blattnervatur einer Weide (*Salix caprea*). (½ nat. Größ.) Nach Ettinghausen

Wassereinschluß beobachten kann (Abb. 56). Durch die Mitte des Blattes verläuft bis zur Spitze ein starker Mittelnerv und von diesem zweigen die Seitennerven ab, die nach ihrer Größe und weiteren Verzweigung verschiedenen Ordnungen zugeteilt werden. Die Verzweigung geht schließlich bis zur Auflösung und Blindendigung. Was wir vor uns haben, sind die bereits bekannten Leitbündel und Leitbündelendigungen. Sie vermitteln die Wasserführung bis ins Blatt

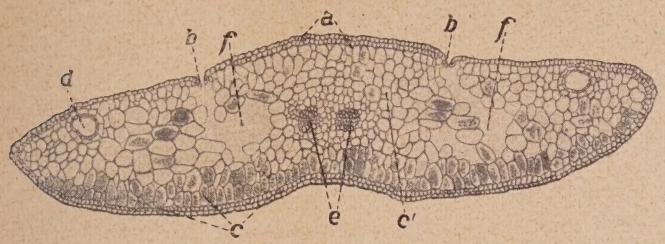


Abb. 57. Blattquerschnitt von *Abies pectinata*. — *a* = zweischichtige Epidermis. *b* = Spaltöffnungen d. Blattunterseite. *c* = palisadenähnliches Assimilationsgewebe. *c'* = Schwammparenchym. *e* = Gefäßbündel. *f* = Natürl. Lücken im Schwammparenchym. *d* = Harzgänge. Nach Sigmund.

hinein und geben hier ihre Stoffe unmittelbar an die Mesophyllzellen ab. Die letzten Verzweigungen der Nerven werden aus nur einer Ringgefäßtracheide gebildet, die von einer Scheide von Parenchymzellen umgeben ist. Querschnitte durch die Nerven zeigen die Anordnung von Tracheiden und Parenchymzellen.

Das Nadelblatt der Kiefer (*Pinus silvestris*) oder der Tanne (*Abies pectinata*) bietet in seinem Bau einige bemerkenswerte Eigentümlichkeiten. Zwischen Holundermark werden Querschnitte durch eine Nadel angefertigt (Abb. 57). Die Epidermis ist hier außerordentlich stark verdickt und die Spaltöffnungen liegen sehr tief. Die die Atemhöhle abschließende Zelle hat U-förmige Gestalt und gehört einem Assimilationsgewebe an, das in seiner Form sehr stark von dem bisher gesehenen abweicht. Die Zellen sind plattenförmig, besitzen viele vorspringende Falten und werden Faltenparenchym genannt. Dieser Bau bewirkt eine Vergrößerung der Assimilationsfläche und bildet gewissermaßen eine Kompensation zur xerophytischen Struktur des Blattes. Im Faltenparenchym bemerken wir dann noch Harzkanäle, die von Sklerenchymscheiden umschlossen sind.

21. Der Bau der Wurzel

Bevor an Quer- und Längsschnitten der Bau verschiedener Wurzeln betrachtet wird, unterrichten wir uns kurz über die Wurzelhaare. Diese außerordentlich feinen und zarten Gebilde fallen an den dem Boden entnommenen Wurzeln meistens nicht auf und wir verschaffen sie uns auf folgende Weise. Eine Schale mit senkrechten Seitenwänden wird zur Hälfte mit Wasser gefüllt und so mit Fließpapier ausgelegt, daß die Oberfläche des Papiers parallel zum Boden des Gefäßes ungefähr 5 cm über der Wasseroberfläche liegt; die Seitenränder des Papiers tauchen bis zum Boden ins Wasser ein. Dadurch erreichen wir, daß das Papier dauernd Feuchtigkeit aufzieht und sie den Weizenkörnern zuführt, die wir in kleine Löcher auf der Oberseite des Papiers eingeklemmt haben. Die Schale setzen wir für einige Tage ins Dunkle und warten die Entwicklung ab. Die Wurzeln wachsen senkrecht zum Wasser hinab und haben kurz hinter ihrer Spitze einen dichten Besatz von weißschimmernden feinen Wurzelhaaren. Mit dem Skalpell wird ein kleines Stückchen dieser Zone abgetrennt und in Wassereinschluß beobachtet. Die Wurzelhaare sind lange Schläuche ohne Querwände, die direkt aus den Epidermiszellen der Wurzel hervorgehen, sind also einfach Ausstülpungen dieser Schicht (Abbild. 58). Durch Diosmose entziehen sie dem Erdboden das Wasser und leiten es dem Zentrum der Wurzel zu. — Nur der mit Wurzelhaaren bedeckte Teil der Wurzel dient der Wasseraufnahme, und je mehr die Spitze der Wurzel weiterwächst, desto weiter verschiebt sich die Zone der Wurzelhaare nach unten; die oberen Wurzelhaare sterben ab. — Durch kräftige Wurzeln der Küchenzwiebel (*Allium cepa*) oder einer Hyazinthe machen wir zwischen Holundermark Querschnitte mit dem Rasiermesser. Die Wurzeln sind leicht durch Kultur zu erhalten. Die Zwiebel wird auf ein mit Wasser gefülltes Hyazinthenglas gelegt und bald beginnt sie auszutreiben. Beim Betrachten mit schwacher Vergrößerung zeigen

Abb. 58. Spitze eines Wurzelhaares mit Bodenteilchen verwachsen. 240f. vergr. Nach Koll.

sich uns im Querschnitt zwei große Kreise; ein äußerer, der durch das Rindengewebe gebildet wird, und ein innerer, der das Leitungsgewebe enthält. Die Oberhaut der Wurzel wird im jungen Stadium aus Epidermiszellen mit den schon bekannten Wurzel-

haaren gebildet. Wächst die Wurzel weiter, so sterben die Haare ab und auch die Epidermis geht zugrunde und an ihre Stelle tritt

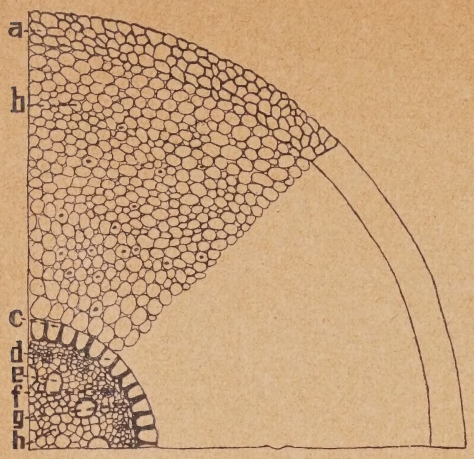


Abb. 59. Wurzelquerschnitt von *Iris germanica*. — *a* = Exodermis. *b* = Rindengewebe. *c* = Endodermis. *d* = Durchlaßzelle der Endodermis. *e* = Gefäße. *f* = Siebteil. *g* = Perizykel. *h* = Zentrales Parenchym. Nach Sigmund

die äußere Schicht des mächtigen Rindengewebes. Die Zellen sind verkorkt (kutinisiert) und werden Exodermis genannt. Dem Kutisgewebe folgt nach innen die Rindenschicht. Sie ist außerordentlich mächtig und wird aus parenchymatischen Zellen gebildet. Die nächste, an die Rinde anschliessende Zellschicht ist die Endodermis, die als Zylinder den ganzen Zentralstrang der Wurzel umschließt und nach Zufügung von Chlorzinkjod zum Präparat gelb gefärbt hervortritt. Der Zentralstrang wird erfüllt von einem radialen Leitbündel, d. h. vom Mittelpunkt aus finden sich die Elemente radial angeordnet. Die Mitte wird eingenommen von einem oder von mehreren großen Gefäßen und an diese schließen sich nach außen immer kleiner werdende Gefäße an. Die inneren, großen Gefäße sind Treppengefäße; die engeren Tracheiden. Zwischen den Strahlen des Gefäßteiles liegen die Siebteile. Die äußersten Zellen des Gefäß- und Siebteiles grenzen nicht unmittelbar an die Endodermis; zwischen diesen beiden Schichten liegt eine einfache Zellschicht, der Perizykel.

Der Querschnitt durch die Wurzel der Schwertlilie (*Iris*) vermittelt uns ein ähnliches Bild (Abb. 59). Wir vergrößern den Übergang vom Zentralstrang zur Rinde stärker und beobachten nun, daß die Endodermis in anderer Weise ausgebildet ist als bei *Allium*. Die Zellen sind nach der dem Wurzelinnern zu gelegenen Seite sehr stark verdickt und in diesem Ring verdickter Zellen finden sich an einzelnen Stellen unverdickte Zellen. Sie liegen meistens vor einem Gefäßbündel, gestatten so einen schnellen Transport des Wassers von der Rinde zum Gefäßteil und werden Durchlaßzellen genannt. Die Elemente des Gefäßbündels sind auch hier wieder radial angeordnet, doch stoßen sie nicht im Mittelpunkt zusammen, sondern lassen einen Raum frei, der von Markgewebe eingenommen wird.

Zum Beweise, daß der Bau der Wurzel bei den Einkeimblättrigen (Monocotyledonen) und Zweikeimblättrigen (Dicotyledonen) vollständig übereinstimmt, schneiden wir jetzt noch die Wurzeln eines Hahnenfußgewächses (*Ranunculus spec.*). Auch hier beobachten wir wieder den zentral gelegenen Gefäßteil, doch ist die Anordnung der Gefäß- und Siebstränge vierstrahlig (Abb. 60).

Längsschnitte durch eine Wurzelspitze sollen uns nun bekanntmachen mit dem Vegetationspunkt der Wurzel. Wir benutzen dazu die Wurzeln einer auskeimenden Getreideart. Die Längsschnitte durch frisches Material müssen genau median geführt werden. Die Spitze wird zwischen Daumen und Zeigefinger eingeklemmt und mit dem Rasiermesser führt man zarte Längsschnitte aus. Das Schneiden erfordert einige Übung, und beim Nichtgelingen der Schnitte klemme man die Spitze in Paraffin ein und schneide mit dem Mikrotom. Der Längsschnitt zeigt uns nun zwei ganz deutlich gegeneinander abgesetzte Schichten. Es sind dies die zum eigentlichen Wurzelkörper

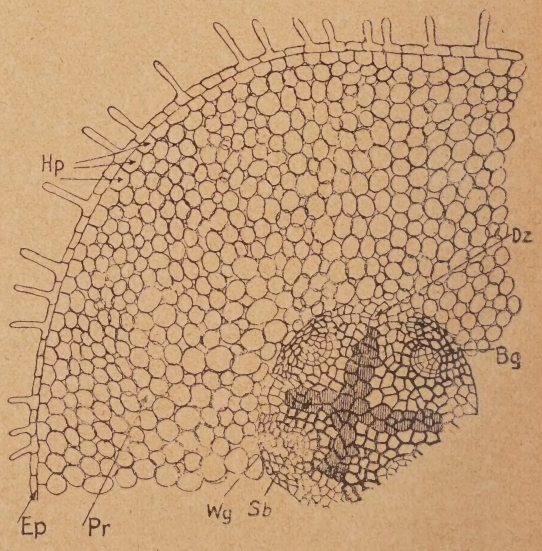


Abb. 60. Wurzelquerschnitt von *Ranunculus lanuginosus*. — *Ep* = Epidermis mit *Hp* = Hypodermis. *Pr* = Parenchym. *Wg* = Wasserröhren. *Sb* = Siebröhren. *Bg* = Bastzellen. *Dz* = Durchlaßzellen. Nach Sigmund

gehörigen Zellen und die, welche als zur Wurzelhaube gehörig gerechnet werden müssen (Abb. 61). Im eigentlichen Wurzelkörper finden sich in der Längsanordnung mehrere Zellreihen, die das Dauergewebe liefern. Im Innern finden wir das Plerom, das anschließend vom Periblem umgeben wird. Nach außen hin umschließt das Dermatogen die inneren Schichten und aus dieser Schicht geht durch Zellverdickung die Außenwand der Wurzel hervor. Das Dermatogen zieht von beiden Seiten her durch die Wurzelhaube hindurch, bildet immer feinere Zellen aus und schließt die eigentliche Wurzelhaube von dem Wurzelkörper ab. In der Mitte des Schnittes vereinigen sich die Zellen des Dermatogens und Periblems zu einer einschichtigen Zellage, vor der das Plerom endet. Nach der Wurzelspitze zu liegen unter dieser Trennungslinie die Initialzellen für die Wurzelhaube, das Kalyptrogen. Die Wurzelhaube wird Kalyptra genannt und sie besteht aus Zellen, die vom Kalyptrogen reihenförmig nach außen hin abgegeben werden. Je weiter sie sich vom Kalyptrogen entfernen, desto größer werden die Zellen und nehmen eine langgestreckte Gestalt an. In der äußersten Schicht trennen die Zellen sich voneinander, werden abgestoßen und gehen schließlich zugrunde. — Aus dem Periblem geht bei der weiteren Entwicklung die Rinde hervor und die innerste, dem Plerom angelagerte Zellreihe bildet die Endodermis. Das Plerom ergibt den schon bekannten Zentralzylinder mit seinen Gefäßen. Im Schnitt deuten einzelne Zellreihen durch ihre Größe schon darauf hin, daß aus ihnen später ein Gefäß hervorgehen wird.

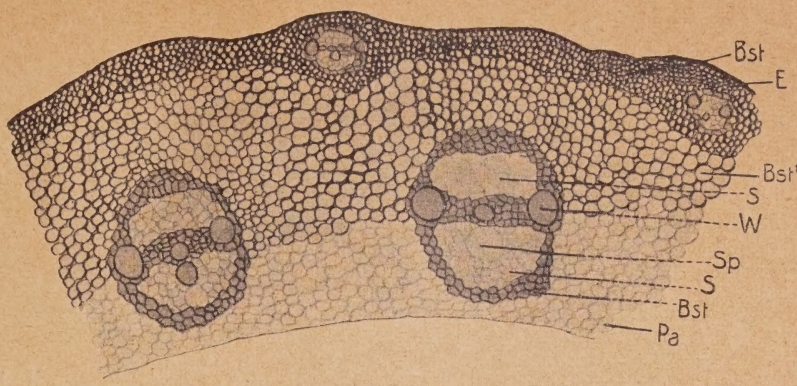


Abb. 62. Halmquerschnitt von Hafer (*Avena sativa*). — *Bst* = äußerer u. *Bst*¹ = innerer Bastring. *E* = Epidermis. *S* = Siebröhren. *W* = Wassergefäße. *Pa* = Parenchym. *Sp* = Spaltriß.. Nach Sigmund

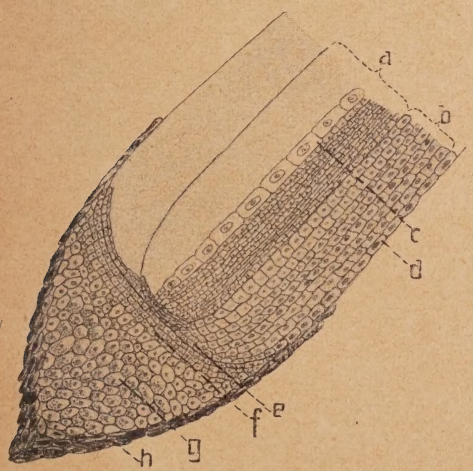


Abb. 61. Längsschnitt durch die Wurzelspitze von *Zea Mays*. — *a* = Pleromzylinder. *b* = Periblem. *c* = Anlage d. Gefäße. *d* = Dermatogen. *e* = Keimschicht. *f* = Wurzelspitze. *g* = Wurzelhaubenzellen mit Statolithenstärke. *h* = verschleimte Zellen d. Wurzelhaube. Nach Sigmund

Der Vegetationspunkt liegt im Innern der Wurzel und ist so vollkommen geschützt. Die Wurzelhaube bildet die Schutzscheide dieser embryonalen Zellen. Sie ist unbedingt notwendig, denn beim Eindringen in den Boden würden Beschädigungen nicht ausbleiben und eine Neuerzeugung von Dauerzellen der Wurzelhaube und des Wurzelkörpers könnte nicht mehr stattfinden.

Die angefertigten Schnitte müssen zur besseren Sichtbarmachung der Gewebe evtl. mit Kalilauge aufgehellt werden. Gut gelungene Schnitte werden mit Safranin nach der Uhrglasschälchenmethode gefärbt und in Glyzeringelatine eingeschlossen.

22. Der Bau des Stammes

Haben wir vorher beobachtet, daß zwischen den Dikotyledonen und Monokotyledonen kein wesentlicher Unterschied im Bau der Wurzel besteht, so müssen wir bei der Bearbeitung des Stammes eine scharfe Trennung dieser beiden Gruppen vornehmen. Am einfachen Orientierungspräparat sieht man schon den Unterschied. Durch einen Haferhalm (*Avena sativa*) stellen wir einen Querschnitt her und übertragen ihn gleich in eine Chlorzinkjodlösung. Die primäre Rinde erscheint braun gefärbt und umgibt einen Zentralzylinder, der aus Grund-

gewebe mit vielen eingestreuten Gefäßbündeln besteht. Die Gefäßbündel liegen in der Nähe der Epidermis etwas enger zusammen, zeigen aber im Grundgewebe selbst

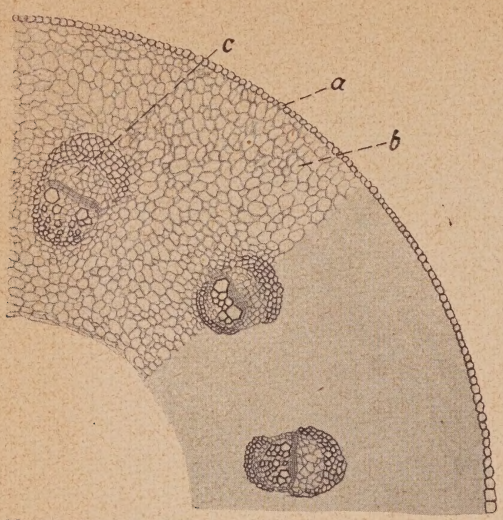


Abb. 63. Stengelquerschnitt von *Ranunculus repens*. — *a* = Epidermis. *b* = Parenchymgewebe. *c* = Gefäßbündel. Nach Sigmund

keine bestimmte Lagerung; sie liegen zerstreut (Abb. 62). Dies der Typ der Monokotyledonen. — Auf dem Querschnitt eines Hahnenfußstengels liegen die Gefäßbündel deutlich im Kreis angeordnet (Abb. 63): Typ der Dikotyledonen.

Zur genaueren Betrachtung müssen wir sehr feine Querschnitte durch den Stengel von *Avena sativa* herstellen und bei stärkerer Vergrößerung auf ein Gefäßbündel einstellen, das nicht zu nahe dem Rande liegt. Auch hier setzen wir gleich einen Tropfen Chlorzinkjodlösung[1]) dem Präparat zu. Das Gefäßbündel ist mit einer Scheide sehr stark rotbraun gefärbter Zellen umgeben und wird dadurch abgeschlossen vom Grundgewebe. Innerhalb dieser Scheide liegen die beiden schon bekannten Teile des Gefäßbündels, die größeren Gefäße selbst, der Xylemteil und der Siebteil, Kribralteil.[2]) Die Gefäße differenzieren sich hier in zwei große Gefäße und zwischen beiden liegen kleinere Ringgefäß- und Schraubengefäßtracheiden. Der Interzellulargang ist durch Zerreißen der Zellen entstanden. Nach außen zu, also in der Richtung der Oberfläche des Stengels, liegt der Siebteil. Während die Gefäße im wesentlichen der Wasserleitung dienen, leiten die Zellen des Siebteils die organischen Stoffe. Sie sind deshalb bedeutend enger gebaut und zwischen ihnen liegen die noch engeren Geleitzellen. Siebteil und Gefäßteil haben durch die Einwirkung der Chlorzinkjodlösung eine violette bezw. gelbbraune Färbung angenommen. Die letzten im Gefäßbündel liegenden Elemente schließen an den Siebteil an und leiten über zur Scheide. Es sind dies Siebröhren und Geleitzellen (Kribralprimanen), die nicht mehr an der Leitung beteiligt sind; sie sind stark verquollen und haben braune Färbung angenommen. — Dieses Leitbündel wird als „geschlossen" bezeichnet, weil sich zwischen dem Siebteil und dem Gefäßteil kein teilungsfähiges Gewebe mehr vorfindet und die Bezeichnung „kollateral" soll andeuten, daß der Siebteil einseitig an den Gefäßteil anschließt.

Schon vorher hatten wir uns in einem Übersichtspräparat die Lage der Leitbündel beim Hahnenfuß angesehen (s. Abb. 63). Jetzt stellen wir feine Querschnitte durch einen Ausläufer her und stellen auf ein Gefäßbündel scharf ein (starke Vergrößerung) (Abb. 64). Die Anordnung der einzelnen Elemente ist die gleiche wie bei *Avena sativa*. Im Innern liegen die Gefäße und sie nehmen von innen nach außen an Größe zu. Zwischen dem Siebteil und dem Gefäßteil schaltet sich hier aber eine besondere Schicht von parallel verlaufenden, sehr zartwandigen Zellen ein, denen dann erst der Siebteil folgt. Es ist dies das Kambium,

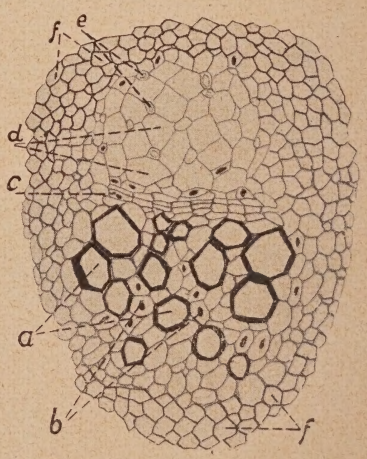


Abb. 64. Gefäßbündelquerschnitt von *Ranunculus repens* bei stärkerer Vergröß. — *a* = Tracheen u. Tracheiden. *b* = Holzparenchym. *c* = Kambium. *d* = Siebröhren. *e* = Siebparenchym u. Geleitzellen. *f* = Gewebskappen aus Sklerenchymzellen. Nach Sigmund

[1]) Chlorzinkjodlösung: 20 Teile Chlorzink, 6,5 Teile Jodkalium und 1,3 Teile Jod in 10,5 Teilen Wasser lösen.

[2]) Gefäßteil (= Vasalteil, Xylem, primärer Holzteil, Hadrom), Siebteil (= Kribralteil, Phloem, primärer Bastteil, Leptom). Gefäßbündel (= Kribrovasalbündel, Fibrovasalbündel, Mestom).

ein teilungsfähiges Gewebe, und das Vorhandensein dieses Gewebes scheidet die Dikotyledonen von den Monokotyledonen. Das Gefäßbündel wird ein „offenes" kollaterales genannt. Die Kambiumzellen geben nach innen immer neue Gefäßzellen und nach außen Siebröhren ab. Die Scheide wird aus stark verdickten Zellen gebildet, doch befinden sich zwischen diesen die leicht erkennbaren Durchlaßzellen. — Der Schnitt wird in Chlorzinkjodlösung beobachtet.

Um auch noch das bikollaterale Gefäßbündel kennen zu lernen, schneiden wir in gleicher Weise die Stengel des Kürbis (*Cucurbita pepo*). Gut ausgebildet finden sich die Gefäßbündel erst in einiger Entfernung von der Wachstumsspitze, und deshalb muß der Schnitt in einem Meter Entfernung von der Spitze geführt werden. Schon mit bloßem Auge kann man die Gefäßbündel, die in zwei Kreisen zu je 5 angeordnet liegen, erkennen (Abb. 65), und um einen guten Schnitt zu erhalten, spalten wir einen kleinen Teil des Stengelstückes heraus und schneiden nun quer. Die einzelnen Teile des Gefäßbündels sind uns ja schon aus den vorigen Schnitten bekannt, und deshalb achten wir nur noch auf die Lage der einzelnen Elemente zueinander. In der Mitte liegt von Vasalparenchym umschlossen der Gefäßteil und nach innen und nach außen schließen sich unterbrochen vom Kambium die Siebteile an. Eine eigentliche Scheide ist nicht ausgebildet, das Gefäßbündel geht unmittelbar in das Grundgewebe über.

Dauerpräparate von diesen Schnitten wer-

Abb. 66. Stammquerschnitt einer einjährigen *Aristolochia sipho*. — *P* = Mark. *P*$_1$ = Parenchym. *Wr* = Wasserröhren d. Gefäßteiles. *Kb* = Kambium. *S* = Siebröhren u. Geleitzellen. *Rp* = Rindenparenchym. *Si* = innerer Sklerenchymring. *Sa* = äußerer Ring aus Kollenchymzellen. Nach Sigmund

den nach der Uhrglasschälchenmethode angefertigt. Die Färbung mit Safranin (vergl. S. 35) ist sehr haltbar. Die Schnitte müssen vor dem Einbringen in die Farbe aber erst mit einer 1%igen Chromsäurelösung zwei Stunden gebeizt und dann $^1/_4$ Stunde in Wasser ausgewaschen werden. Die Elemente des Gefäßteils erscheinen nach der Färbung rot und die des Siebteils mehr bräunlich. Eingeschlossen wird in Kanadabalsam.

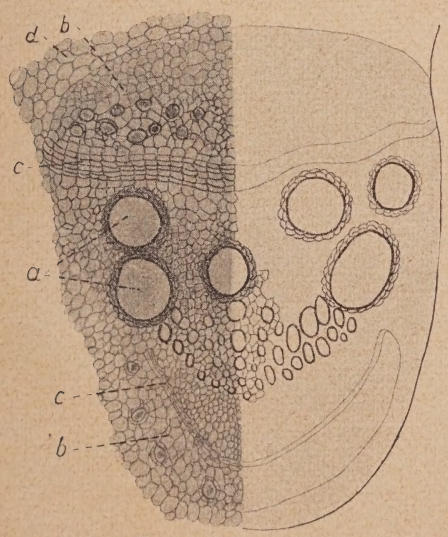


Abb. 65. Gefäßbündelquerschnitt von *Cucurbita pepo*. — *a* = weite Tracheen von Holzparenchymzellen umgeben. *b* = Siebteil. *c* = Kambium. *d* = Parenchymzellen. Nach Sigmund

Durch das Kambium wird der Gefäßteil (Holzteil) und Siebteil (Bastteil) dauernd ergänzt; von hier aus erfolgt also das Dickenwachstum des Stammes. Ein sehr geeignetes Objekt zur Untersuchung dieses Dickenwachstums ist der Pfeifenstrauch (*Aristolochia sipho*). Zweige von 5 mm Dicke müssen im Juni geschnitten und in Alkohol eingelegt werden. Auf zarten Querschnitten sieht man das Mark und die ringförmig angeordneten Gefäßbündel, die umgeben werden von einem Sklerenchymring (Abb. 66). Zwischen dem Siebteil und Gefäßteil zieht sich ein hellschimmernder Ring hindurch und er erfährt auch zwischen den Gefäßbündeln keine Unterbrechung; es ist der Kambiumring. Nach innen wird dauernd neues Holz ausgebildet und nach außen erfolgt innerhalb der Gefäßbündel die Erzeugung von Bast. Zwischen den Gefäßbündeln liegen die primären Markstrahlen. Durch die Kambiumtätigkeit in den Gefäßbündeln wird auch das zwischen den Gefäßbündeln be-

findliche Gewebe wieder zur Teilung angeregt und es bildet das Interfaszikularkambium aus, das zusammen mit dem Fas-

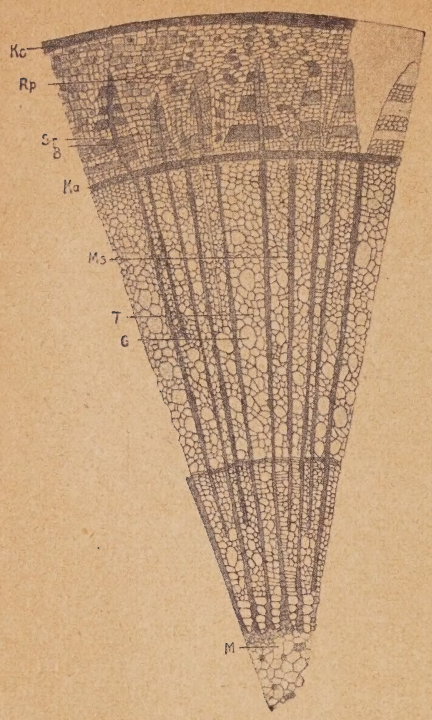


Abb. 67. Querschnitt durch einen einjährigen Lindenstamm. — *M* = Mark. *G* = getüpfeltes Gefäß. *T* = Tracheiden des Holzparenchyms. *Ms* = Markstrahl. *Ka* = Kambium. *Ba* = Bastfaserbündel. *Sr* = Siebröhren u. Geleitzellen. *Rp* = Rindenparenchym. *Ko* = Korkschichten der Rinde. Nach Sigmund

zikularkambium den Kambiumring ergibt. — Mit Chlorzinkjodlösung färben!

Der Bau des Linden- und Kiefernholzes läßt sich aus den beigefügten Abbild. 67 und 68 leicht verstehen. Wir führen Quer- und Längsschnitte[1]) durch einen einjährigen Zweig der Linde aus. Die Gefäßbündel umschließen als vollständigen Ring das Mark, sind sehr dicht gelagert und bilden innen den Holz- und außen den Siebteil aus. Zwischen diesen beiden Schichten liegt die schon bekannte Kambiumzone. Die Markstrahlen dringen bis in die Rinde vor und zerlegen den Siebteil, in welchem Bastzellen, Siebröhren und Geleitzellen sichtbar sind, in einzelne Abschnitte. Auf die nach außen anschließende Zone des Korkes wollen wir hier noch nicht eingehen. — Der Längsschnitt zeigt die verschiedenen Elemente des Holzkörpers: Holzparenchymzellen, Tracheiden und weite Gefäße wechseln miteinander ab.

Quer- und Längsschnitte[1]) durch einjährige Kiefernzweige zeigen den gleichen Bau wie Lindenzweige. Der Holzkörper umschließt den zentral gelegenen Markteil und durch den Holzkörper gehen die Markstrahlen hindurch. Kambium und Siebteil setzen sich nach außen hin an und dann folgt das lockere Rindenparenchym. Auf dem Querschnitt sehen wir im Rindenparenchym die ovalen Harzgänge. Korkbildungszone und Epidermis schließen das Gewebe ab. Der Bau des Holzes im Längsschnitt wird aus Abb. 69 entnommen.

Zum Färben von Paraffinschnitten verwende man Gentianaviolett in wässeriger oder halbkonzentrierter Lösung. Die Färbung ist in einigen Minuten beendet und die Präparate müssen in 50—70 %igem Alkohol ausgewaschen werden. Differenziert wird mit 1 %igem Salzsäurealkohol und danach kann über Xylol in Kanadabalsam eingeschlossen werden. In richtig differenzierten Präparaten erscheint das Holz dunkelblau und die nicht verholzten Zellen lichtblau.

An jungen Zweigen des Pfeifenstrauches (*Aristolochia*) sieht man, daß die grüne Epidermis langsam verschwindet, sich in Fetzen ablösen läßt und einem Mantel von Korkzellen weicht. Die Bildung des Korkes geht von der Rindenschicht aus, die ein besonderes Korkkambium erzeugt. Dieses gibt nach außen in radialer Anordnung Korkzellen ab und nach innen verstärkt es die Rinde. Alle aus dem Korkkambium erzeugten Gewebe werden als Periderm

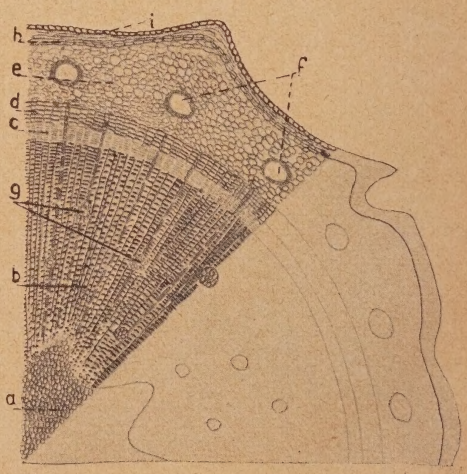


Abb. 68. Querschnitt durch einen einjährigen Stamm von *Pinus silvestris*. — *a* = Mark. *b* = Holzteil d. Stammes. *c* = Kambium. *d* = Siebteil d. Stammes. *e* = Rinde mit Harzgängen *f*. *h* = Korkkambium. *i* = Epidermis. Nach Sigmund

bezeichnet. Die Korkzellen vermögen lange Zeit infolge ihrer Dehnbarkeit dem Dickenwachstum des Stengels zu folgen; schließlich

[1]) Das Material wird in Glyzerin erweicht und ohne Einbettung mit dem Mikrotom geschnitten. Vgl. S. 12.

zerreißen sie aber und schilfern ab (Abb. 70). Kalilauge färbt nach längerer Einwirkung die Korkzellen gelb.

Die braune Korkschicht bildet aber nicht einen allseits festgeschlossenen Mantel um die inneren Gewebe; sie wird durchsetzt von sogenannten Rindenporen (Lentizellen, siehe Abb. 70 k). Sie vermitteln den Gasaustausch.

Schon vorher wurde gesagt, daß die aus dem Korkkambium hervorgegangenen Elemente dem Dickenwachstum nicht standhalten können und zersprengt werden. Das gilt besonders vom Peridermring, und seine Zersprengung innerhalb des Gewebes ruft eine Neuanlage in tieferen Schichten hervor. So können mehrere zersprengte Peridermringe übereinander liegen und die zwischen ihnen befindlichen Zellen des Rindengewebes sterben ab. Diese komplizierten Bildungen können wir an der Föhrenrinde gut beobachten. In Querschnitten, die vorher zum Austreiben der Luft in Alkohol gelegen haben, sieht man die Peridermzonen in verschiedenen Schichten übereinander und zwischen ihnen das abgestorbene Rindengewebe. Die Gesamtheit dieser Schichten bildet die Borke (s. Abb. 69).

23. Der Vegetationspunkt des Stammes

Vegetationspunkte sind bei den Wasserpflanzen gut zu beobachten und es stehen

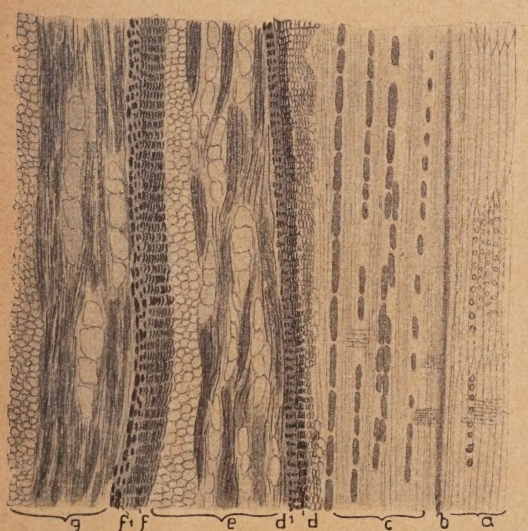


Abb. 69. Längsschnitt durch Rinde u. Borke von *Pinus silvestris*. — *a* = Tracheiden. *b* = Kambium. *c* = Siebteil. *d* = Korkkambium. *e* = letzte Rindenschicht. *f* = vorletztes Korkkambium. *f*¹ = vorletzte Korkschicht. *g* = vorletzte nach außen geschobene Rindenschicht. Nach Sigmund

uns hier eine ganze Reihe von Objekten zur Auswahl: Wasserpest (*Elodea canadensis*), Hornkraut (*Ceratophyllum demersum*), Tausendblatt (*Myriophyllum*) oder auch der Tannenwedel (*Hippuris vulgaris*). *Elodea* ist sehr geeignet

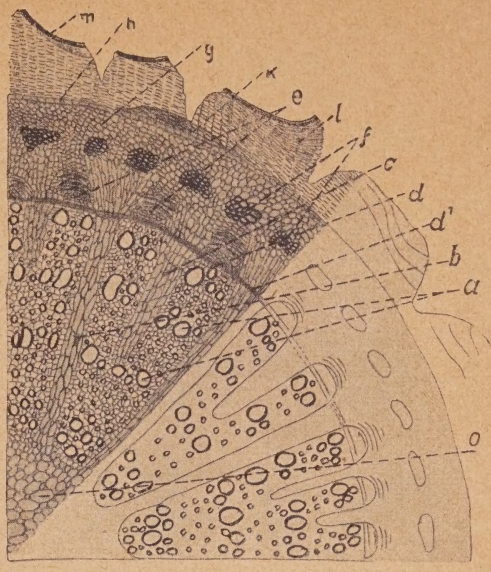


Abb. 70. Querschnitt durch einen mehrjährigen Zweig von *Aristolochia sipho*. — *a* = Holzteil. *b* = primärer u. *c* = sekundärer Markstrahl. *d* u. *d*¹ = Kambium. *e* = Siebteil d. Gefäßbündelringes. *f* = Reste d. zersprengten Sklerenchymringes. *g* = Rinde. *h* = Korkkambium. *k* = unverkorktes Gewebspolster einer Lentizelle. *l* = Kork. *m* = Reste d. Epidermis. *o* = Mark. Nach Sigmund

für unsere Untersuchungen und der einzuschlagende Weg richtet sich hier nach der Geschicklichkeit des Präparators. Wir schneiden mit einer Schere die Endknospe eines Sprosses ab und übertragen diese in einen Tropfen Wasser auf den Objektträger. Ganz vorsichtig beginnt man mit zwei Nadeln die Blättchen abzupfen. Ein Präpariermikroskop oder eine Lupe leistet bei dieser Arbeit vorzügliche Dienste, denn die abzunehmenden Blättchen werden nach innen immer kleiner und besonders die Entfernung der letzten Blättchen ist ohne Lupe gar nicht möglich. Die Gefahr der Beschädigung des Vegetationspunktes ist recht groß und ein von der Nadel berührter Punkt ist meistens für die Beobachtung unbrauchbar. Der auf der Endknospe liegende Vegetationspunkt erscheint mit dieser zusammen als kleine weiße Spitze, und das Objekt muß sehr vorsichtig mit einem Deckglas versehen werden, damit keine Zerquetschungen vorkommen; das Deckglas erhält Wachsfüßchen. Schon bei schwacher Vergrößerung (Aufhellen mit Eau de Javelle!) sehen wir die Stammesspitze ganz deutlich als kleinen Kegel sich aus den nach unten zu immer größer werdenden Blattanlagen herausheben. Die Zellanordnung ist nicht ganz

leicht zu analysieren, weil das Objekt nicht im Schnitt vorliegt. Der Beobachter muß auf den optischen Durchschnitt einstellen und der befindet sich dann in der richtigen Lage, wenn der Scheitel des Sprosses die stärkste Wölbung zeigt. Als einzellige Schicht überzieht das Dermatogen den ganzen Scheitel des Vegetationskegels und daran anschließend folgt meistens in drei Zellreihen das Periblem. Das Plerom bildet den Mittelstrang und es endet mit stumpfer Spitze unter dem Periblem. Aus dem Plerom geht das zentrale Gefäßbündel hervor und das Periblem wird bei weiterer Entwicklung die primäre Rinde liefern. Ferner sind im Präparat noch kleinere und größere Ausstülpungen des Periblems zu beobachten; es sind dies verschiedenaltrige Blattanlagen. — Besser lassen sich alle diese Verhältnisse an mit dem Mikrotom hergestellten Schnitten beobachten. Nach der Präparation führen wir die freigelegte Endknospe durch die Alkoholreihe aufwärts bis ins Xylol und betten dann in Paraffin ein. Die Schnitte werden in der bekannten Weise hergestellt und mit Eisenhämatoxylin nach Heidenhain gefärbt. Das Plasma und die Zellkerne treten nach dieser Färbung blauschwarz hervor, und zur Sichtbarmachung der Zellwände überführt man nach dem Differenzieren in Eosin-Nelkenöl (½ Stunde), wäscht mit Xylol aus und schließt in Kanadabalsam ein. Neben der blauschwarzen Kern- und Plasmafärbung tritt die rote Farbe der Zellwände schön hervor.

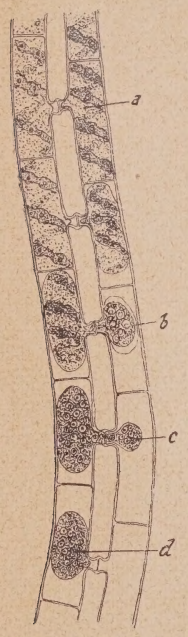


Abb. 71. *Spirogyra* spec. mit beginnender Kopulation. — *a*—*d* = vier aufeinanderfolgende Phasen der Kopulation. Nach Sigmund

Abb. 72. *Spirogyra* mit fertigen Zygosporen *a*. *b* = leere Zellen des männl. Algenfadens. Nach Sigmund

24. Bau und Fortpflanzung der Algen

a) Konjugaten. Die Konjugaten bilden auf Grund ihrer Fortpflanzungsverhältnisse innerhalb der Algen eine ganz streng abgeschlossene Gruppe. Die Fortpflanzung erfolgt durch Vereinigung oder Konjugation zweier geißelloser Gameten, die eine Zygospore bilden. Die Schraubenalge (*Spirogyra*) ist wohl die bekannteste Alge aus dieser Gruppe und sie kommt im Süßwasser als fädige, grüne Watten bildende Form recht häufig vor. Der Faden ist unverzweigt und jede Zelle enthält neben dem Zellkern einen bandförmigen, schraubigen Chloroplasten.

Zur Beobachtung des Kopulationsvorganges müssen wir geeignetes Material aufsuchen, das freilich nicht zu allen Jahreszeiten zu finden ist. In Kopulation befindliche Fäden fallen schon im Freien durch ihr krauses Aussehen auf. Sollten sich keine günstigen Stadien finden lassen, so muß die Kopulation angeregt werden. Von den Algenmassen werden nicht zu viele Fäden in eine kleine Schale übertragen, deren Boden mit Schlamm bedeckt ist. Die Fäden halten sich lange in solchen Kulturen. Setzt man die Schale dem Sonnenlicht aus und läßt das Wasser langsam verdunsten, dann schreiten die Algen meistens zur Kopulation. Beim Nichtglücken dieses Versuches bringen wir in der Zeit von Februar bis Mai die Kultur in eine 2—4%ige Rohrzuckerlösung und stellen sie in die Sonne (nach Strasburger-Koernicke). Der Erfolg wird dann bald zu beobachten sein.

Reizvoll ist es, die Kopulation am lebenden Material zu beobachten. Um die Fäden nicht durch das Deckglas zu zerdrücken, muß die Beobachtung in einer feuchten Kammer erfolgen. Wir schneiden uns einen Pappstreifen in Größe des Objektträgers zu und schneiden in der Mitte ein Feld aus, das etwas kleiner ist als das Deckglas. Der Papprahmen wird ins Wasser geworfen und nachdem er sich vollgesogen hat, auf den Objektträger gelegt. Das Deckglas wird nun mit einem Tropfen der Kulturflüssigkeit bedeckt und die Algen hineingelegt. Zur Beobachtung muß der Tropfen nach unten in die Kammer hineinhängen, das Deckglas muß also umgekehrt aufgelegt werden (Strasburger-Koernicke). Unter dem Mikroskop sehen wir nun, daß die Kopulation leiterförmig erfolgt. Zwei Fäden haben sich eng aneinander gelegt und haben Fortsätze aufeinander zu getrieben (Abb. 71 u. 72). Finden

sich schon leere Fäden, dann wird man immer auf das Geschlecht der beiden Fäden schließen können, der leere Faden ist männ-

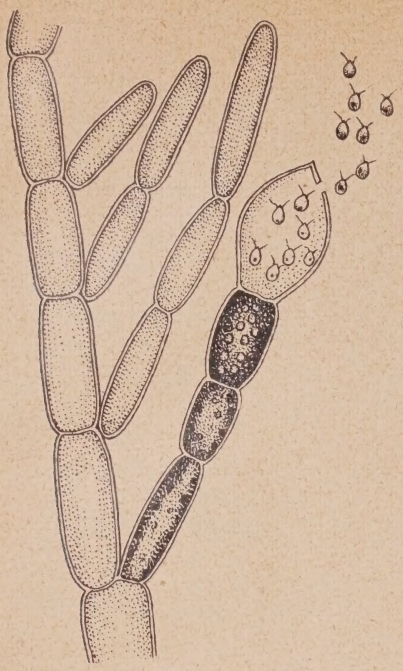


Abb. 73. *Cladophora glomerata*. 100f. vergr.

lich. Bevor das Plasma des männlichen Fadens in den weiblichen hinüberwandert, rundet es sich ab, zieht sich von der Zellwand zurück und beginnt in den Kopulationskanal einzudringen. Die Mittelwand des Kanals löst sich auf, der Inhalt wandert hinüber und verschmilzt mit dem Inhalt der weiblichen Zelle, der sich vorher auch abgerundet hat. Die so entstandene Zygote wird kugelförmig und umgibt sich mit einer doppelten Membran. Der ganze Vorgang der Vereinigung dauert ungefähr eine Stunde.

Zum genauen Studium der Kernverschmelzung und der Bildung des Zygotenkernes muß das Material fixiert werden. Das Objekt wird mit einer 1%igen Osmiumsäure übergossen, in verdünntes Glyzerin übertragen und nach der auf S. 37 beschriebenen Methode muß das Glyzerin langsam eindicken. Das so vorbehandelte Material wird dann in Glyzeringelatine eingebettet. An günstigen Stadien kann man sehen, daß die Kerne der beiden Gameten sich nähern und verschmelzen. — Genauere Beobachtung der Kernverschmelzung und der später erfolgenden Reduktion der Chromosomenzahlen müssen an fixiertem und geschnittenem Material gemacht werden. Die Fixierung erfolgt wie vorher mit einer 1%igen Osmiumsäurelösung und nachdem gründlich ausgewaschen ist, wird über Xylol oder Benzol in Paraffin eingebettet. Nach dem Schneiden muß die Schwärzung durch Einwirkung von 1%iger Chromsäure entfernt werden, die mit Wasser ausgewaschen wird. Die Färbung erfolgt mit Eisenhämatoxylin (Heidenhain). — Der aus der Kopulation der beiden Gametenkerne hervorgegangene Kopulationskern teilt sich zweimal unter gleichzeitigem Erfolgen der Chromosomenreduktion. Es sind in der Zygote dann vier Kerne vorhanden, von denen jedoch drei degenerieren. Der vierte Kern tritt bei der Entwicklung zum Algenfaden in die Teilungsstadien ein.

b) Chlorophyceen. Zusammen mit *Spirogyra* wird man in Aquarien immer *Cladophora* beobachten können, eine sehr robuste und verzweigte Grünalge, die in Wassereinschluß untersucht wird

Abb. 74. *Claviceps purpurea*. 1 = Roggenähre mit reifen Sklerotien. 2 = gekeimtes Sklerotium mit gestielten Fruchtkörpern. 3 = Längsschnitt durch einen Fruchtkörper mit zahlreichen Perithecien. 4 = einzelnes Perithecium mit den langen, schmalen Asci, stärker vergr.

(Abb. 73). Die Zellen sind sehr groß, vielkernig und die Chromatophoren zeigen häufig ein netzförmiges Aussehen. Die Beobachtung der ungeschlechtlich gebildeten Schwärmsporen gelingt am besten an Material, das direkt aus fliessendem Wasser (Bach) in eine flache Schale übertragen und mit nur wenig Wasser bedeckt wird. Die Umbildung des Zellinhaltes zu Schwärmsporen beginnt an der Spitze der Fäden. Die Zellen erscheinen besonders dunkelgrün und durch Druck von innen wird die verquollene Zellwand zerrissen und die Schwärmsporen oder Gameten treten aus. Die Schwärmsporen sind grüngefärbt, besitzen einen roten Augenfleck und am Vorderende zwei Geißeln. Sie bewegen sich — wenn die Beobachtung im Hängetropfen erfolgt — langsam dem Lichte zu und setzen sich fest. Aus den Schwärmsporen geht später die Alge hervor. — Fixierung und Färbung wie bei *Spirogyra*.

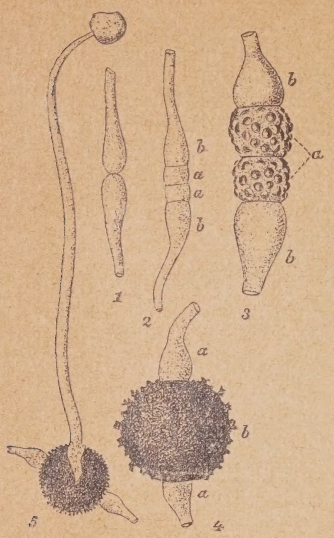


Abb. 75. *Mucor mucedo*, Zygosporenbildung. — 1 = Konjugationsäste. 2 = Abgrenzung der Gameten *a* von den Suspensoren *b*. 3 = weiteres Stadium, Warzenbildung. 4 = reife Zygospore *b* zwischen den Suspensoren *a*. 5 = Keimung der Zygosporen mit einem Sporangium. (Aus Strasburger)

25. Bau und Fortpflanzung der Pilze

Zu den Pilzen gehören fast alle Pflanzen, die des Blattgrüns entbehren. Sie lassen sich durch dieses Merkmal verhältnismäßig leicht abgrenzen. Sie sind die Konsumenten in der Natur, die durch ihre Tätigkeit dafür sorgen, daß die organische Substanz sich nicht aufhäuft, sondern wieder in den Kreislauf der Stoffe eintritt. Während die grünen Pflanzen sich selbst ernähren (= autotrophe Ernährung), empfangen die Pilze die fertige organische Substanz, ernähren sich mit Hilfe der grünen Pflanzen (= metatrophe Ernährung).

Das Vegetationssystem der Pilze ist einfach gebaut und geht immer — auch bei den höheren Pilzen — zurück auf ein fädiges Geflecht, das als Myzel bezeichnet wird. Die einzelnen, das Myzel zusammensetzenden Schläuche nennt man Hyphen. Die Hyphen sind sehr fein und mit dem bloßen Auge meistens nicht zu erkennen. Häufig entziehen sie sich auch der unmittelbaren Beobachtung durch ihre Lebensweise. Die als Hutpilze bezeichneten, überall in Wald und Feld vorkommenden Pilze sind nur die Fruchtkörper. Das Myzel selbst steckt im Boden drin und durchzieht als fädiges Wurzelgeflecht den ganzen Boden. Die Gesamtheit der Hyphen, das Myzel, kann die verschiedensten Formen annehmen. Beim Schimmelpilz erscheint es als weißliches oder grünliches Gespinst, beim Hausschwamm durchzieht es als Strang das ganze Holz und selbst steinharte Gebilde (Sklerotien) werden beim Mutterkorn (*Claviceps purpurea*) beobachtet (Abb. 74).

Die Fortpflanzungsorgane der Pilze sind sehr vielgestaltig. Der Sexualakt ist recht versteckt; daher werden wir uns bei den folgenden Ausführungen immer auf Dinge beschränken müssen, die leicht zu beobachten sind.

Aus der Gruppe der Algenpilze (Phycomyceten) können wir den Kopfschimmel (*Mucor mucedo*) durch eine einfache Kultur gewinnen. Wir füllen einen flachen Teller mit Wasser, stellen einen Block hinein, legen ein Stückchen feuchtes Brot auf den Block und decken mit einer Glasglocke zu, deren Unterrand ins Wasser eintaucht. Nach einigen Tagen wird sich auf dem Brot ein weißlicher Filz zeigen. Aus den Verzweigungen heben sich auf kleinen Stielchen, mit der Lupe erkennbar, bräun-

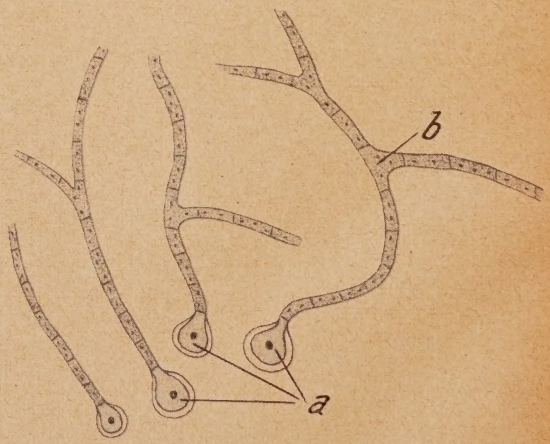


Abb. 76. *Penicillium crustaceum*, rechts keimende Sporen *a*. *b* = Keimschlauch (gegliederte Hyphen). Nach Sigmund

liche Punkte empor. Mit der Lanzette übertragen wir ein wenig von dem Myzel auf den Objektträger mit Wasser, geben etwas Alkohol hinzu und beobachten nun. Die weißlichen Fäden sind wenig verzweigte Schläuche mit unregelmäßigen Querwänden und aus diesen Schläuchen geht der querwandlose Stiel mit dem Köpfchen (Sporangium) hervor (Abb. 75). Der Stiel setzt sich noch ein kleines Stückchen in das Sporangium hinein fort, grenzt sich durch eine vorspringende Wand ab und bildet hier die sogenannte Columella. Das Sporangium zerfließt in Wasser sehr leicht und gibt die Sporen, die in einem farblosen Schleim eingebettet liegen, frei.

Zur Herstellung von Dauerpräparaten schreite man zur Einzelkultur. Pferdemist ist ein sehr guter Nährboden für diesen Pilz, und durch Abkochen und Filtrieren des Mistes stellt man sich eine brauchbare Nährlösung her. Alle zur Verwendung kommenden Glasgeräte müssen vor dem Gebrauch gründlich abgekocht werden. Die Objektträger legt man in eine 10%ige Salzsäurelösung ein und spült sie kurz vor der Beschickung mit kochendem destill. Wasser ab (Strasburger-Koernicke). Zur Aussat darf nur eine Spore kommen und zur Erzielung einer guten Kultur geht man folgendermaßen vor: In ein Uhrschälchen mit Wasser wird ein Sporangium übertragen. Die Wand löst sich bald auf und die Sporen befinden sich jetzt im Wasser. Mit einer abgeglühten Nadel nimmt man einen Tropfen heraus und zieht ihn zu einem langen Strich auf dem Objektträger aus. Dann wird unter dem Mikroskop ohne Deckglas durchmustert. Findet sich nur eine Spore in dem Tropfen, so kann gleich ein Tropfen der Nährlösung zugesetzt werden. In dieser Weise bereitet man sich mehrere Objektträger vor und stellt sie alle auf ein kleines Gestell in die feuchte Kammer. In wenigen Tagen werden die Myzele herangewachsen sein und zur Erreichung einer Entwicklungsübersicht fixiert man die einzelnen Objektträger in verschiedenen Zeitabständen. Gute Resultate ergibt die Fixierung mit der schwächeren Flemmingschen Lösung und die Färbung mit Eisenhämatoxylin. Fixierung und Färbung werden immer auf dem Objektträger vorgenommen.

Mucor mucedo ist heterothallisch, d. h. es bilden sich männliche und weibliche Thalli aus und erst nach der Kopulation können Zygosporen gebildet werden (s. Abb. 75). Wir breiten Pferdemist in einer flachen Schale aus und erwarten jetzt die Entwicklung. Sind männliche und weibliche Thalli vorhanden, so entstehen durch Hyphen-Verschmelzungen die Zygosporen. Die Myzelfäden schwellen an den Enden an, nähern sich und treten in Berührung miteinander. In einiger Entfernung von der Berührungswand werden Scheidewände ausgebildet und nach kurzer Zeit wird die Berührungswand aufgelöst. Die Zellinhalte beider abgetrennter Zellen treten in Ver-

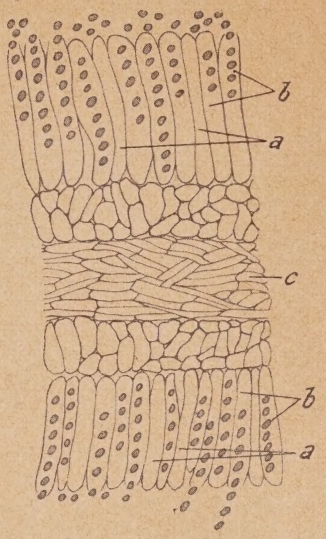


Abb. 77. *Morchella esculenta*, Ascosporenlager, quer. — *a* = Paraphysen. *b* = Sporenschläuche. *c* = Hyphen einer Rippe. Nach Sigmund

bindung miteinander, umgeben sich mit einer gemeinsamen Membran und dieses neue Gebilde wächst heran zur Zygospore, die durch ihre dunkle Farbe auffällt. Unter dem Mikroskop zeigt sie sich als dunkle Kugel mit warziger Oberfläche. Aus der keimenden Zygospore geht wieder das schon vorher beschriebene Myzel mit seinen Sporangien hervor.

Bei den Schlauchpilzen (Askomyzeten) wollen wir zuerst die Konidienfruchtform eines Schimmelpilzes (*Penicillium crustaceum*) kennen lernen (Abbild. 76). Wie zur Gewinnung der Mucorineen bereiten wir ein Stück Brot als Kultursubstrat vor. Auf dem Brot werden zuerst Mucorineen erscheinen, doch werden diese bald verdrängt von einem blaugrünen Geflecht, das dem *Penicillium* zugehört. Mit einer Lanzette übertragen wir ein wenig des Myzels auf den Objektträger, fügen einen Tropfen Glyzerin hinzu und zur Entfernung der Luft noch einen Tropfen Alkohol. Das Myzel sinkt dann unter, ist luftfrei und kann gut beobachtet werden. Die verzweigten Hyphen sind durch Querwände geteilt, enthalten ein feinkörniges Plasma und aus einzelnen Hyphen gehen die wie Pinsel gestalteten Konidienträger hervor. Die Spitze

des Konidienträgers verzweigt sich, bildet die Sterigmen aus und von diesen werden am Grunde immer neue kugelförmige Konidien

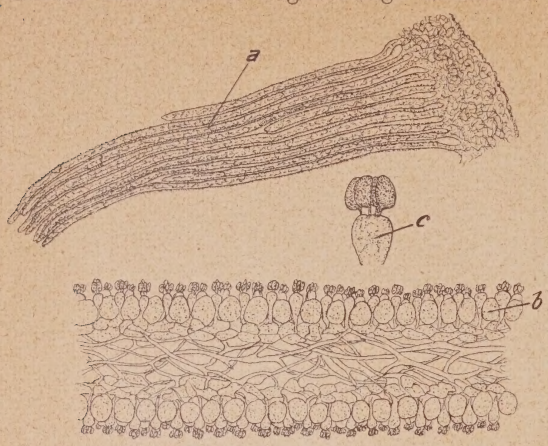


Abb. 78. *Psalliota (Agaricus campestris)*. Hymenium, quer. — *a* = Lamelle des Hutes, quer (11 f. vergr.). *b* = eine Lamelle mit Basidien (225 f. verg.). *c* = eine Basidie mit 4 Basidiosporen (375 f. vergr.). Nach Sigmund

abgeschnürt, so daß eine Kette entsteht. Die oberen Konidien werden ausgestreut und durch neue am Grunde gebildete ersetzt. — Die Fixierung erfolgt mit Alkohol oder schwacher Flemmingscher Lösung, die Färbung mit Eisenhämatoxylin.

Über den Bau der Schläuche können wir uns bei der Morchel (*Morchella esculenta*) unterrichten, die als beliebter Speisepilz bekannt ist (Abb. 77). Der Fruchtkörper ist sehr stark gefeldert und zwischen den vorspringenden Leisten befinden sich immer tiefe Falten. Mit dem Rasiermesser führen wir vorsichtig Schnitte senkrecht zu einer Vertiefung aus. Aus dem subhymenialen Gewebe entspringen die Saftfäden (Paraphysen) und Schläuche (Asci), die 8 Sporen enthalten. — Zur Weiterpräparation übertragen wir den Schnitt aus Wasser in Eisenalaun und färben mit Hämatoxylin.

Die dritte große Klasse der Pilze sind die Ständerpilze oder Basidiomyceten. Zur Untersuchung gebrauchen wir

Abb. 79. Lagerquerschnitt von *Xanthoria parietina*. — *or* = obere Rinde. *go* = Gonidienschicht. *m* = Mark. *ur* = untere Rinde. Vergr. Nach Migula

einen Champignon (*Psalliota campestris*). An der Unterseite des Hutes trägt dieser Pilz lamellenartige Vorsprünge und in Richtung der Lamellen schneiden wir ein kleines Stückchen aus dem Hut heraus. Der eigentliche Querschnitt wird senkrecht zur Lamellenrichtung ausgeführt und er sieht unter dem Mikroskop wie ein Kamm aus, dessen Zinken durch die geschnittenen Lamellen gebildet werden (Abb. 78). Das innere Gewebe der Lamellen wird Trama genannt und daran anschließend nach außen finden wir kurzgliedrige Hyphenabschnitte, die Subhymenialschicht. Aus dieser entspringen die Paraphysen und Basidien. Die am oberen Ende mit Sterigmen versehenen keulenförmigen Basidien schnüren die Sporen ab. — Zur Untersuchung des Hymeniums werden Ausschnitte aus dem Hut mit Kaisers Sublimat-Eisessig fixiert, in Paraffin eingebettet, mit dem Mikrotom geschnitten und mit Eisenhämatoxylin gefärbt.

26. Bau und Fortpflanzung der Flechten

Zur Untersuchung der beiden Typen des Thallusbaues werden Exemplare von *Xan-*

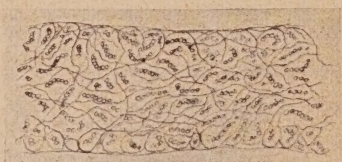


Abb. 80. Schnitt durch das unberindete Lager von *Collema multifidum*. Nach Migula

thoria parietina und *Collema* gebraucht. *Xanthoria parietina*, die gelbe Wandschüsselflechte, ist eine an Mauern, altem Holz, an Linden und Kastanien recht häufig auftretende Flechte, die durch ihre leuchtend gelbe Farbe sofort auffällt. Die Gallertflechte *Collema* liebt sandige Böden mit geringer Vegetation und sie bedeckt hier als dunkelgrüne gallertige Masse größere Flächen. Ein Teil der Beobachtung kann an dünnen Rasiermesserschnitten (Aufhellen durch Kalilauge und Chloralhydrat) gemacht werden, doch sind mit Hämatoxylin gefärbte Mikrotomschnitte bedeutend besser geeignet. Bei der Einbettung ist auf die an sich schon recht spröde Konsistenz der Objekte Rücksicht zu nehmen und es wird sich nicht empfehlen, über Xylol einzubetten, da die Objekte später beim Schneiden wie Glas splittern. Die Entwässerung der fixierten Objekte wird mit Glyzerin vorgenommen und die Übertragung in Paraffin erfolgt über Zedernholzöl.

Der Körper der Flechten wird aus Pilzen und Algen gebildet, die in einem Abhängig-

keitsverhältnis voneinander stehen. Die Pilze vermögen die im Wasser gelösten anorganischen Stoffe nicht zu assimilieren, weil sie des Blattgrüns entbehren; sie führen diese Stoffe den Algen zu und empfangen von diesen die fertigen Assimilationsprodukte zurück. Dieses Zusammenleben von Pilz und Alge bezeichnen wir als Symbiose. Die meisten Flechtenpilze gehören zu den Ascomyceten und ihre Komponenten, die Algen, sind Cyanophyceen oder Chlorophyceen.

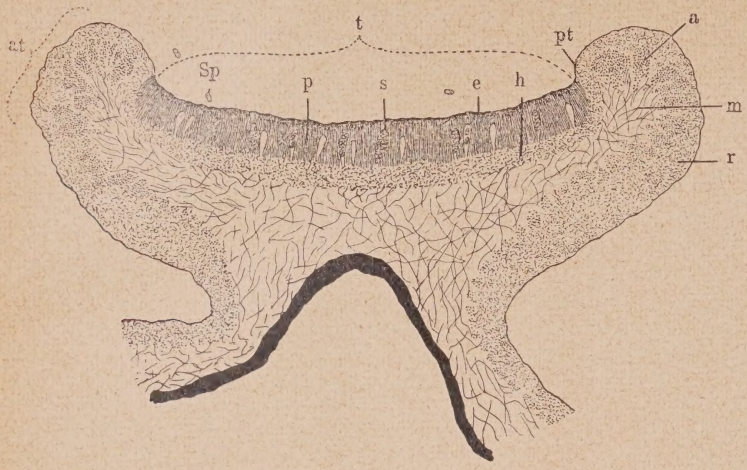


Abb. 81. Schnitt durch ein Apothecium von *Physcia pulverulenta*. Aus Sigmund

Am Querschnitt eines kleinen Thalluslappens von *Xanthoria parietina*, der in Wassereinschluß untersucht wird, sieht man ganz deutlich den geschichteten Aufbau des Thallus (Abb. 79). Die obere Rinde wird durch ein sehr dichtes Hyphengeflecht gebildet; die Einzelhyphen können in ihrem Verlauf nicht mehr beobachtet werden. Darauf folgt die Algenschicht (Gonidienzone). Die Algen liegen hier ganz eng zusammen, durchziehen diese Zone wie ein grünes Band und werden nach unten zu von sehr lockeren Hyphen, der Markhyphenzone, begrenzt, der dann die untere Rinde folgt. Dieser Aufbau ist bei der Mehrzahl der Flechtenthalli zu beobachten, der Thallus ist geschichtet oder heteromer.

In gleicher Weise wird der ungeschichtete oder homöomere Thallus einer Gallertflechte (*Collema*) geschnitten (Abb. 80). Von der Ausbildung irgendeiner Schichtung ist im Querschnitt nichts zu bemerken. Die Hyphen verlaufen ganz regellos in den Gallertmassen der Algenhüllen und diese durchziehen den Thallus in unregelmäßig gelagerten Schnüren. Der Aufbau des Thallus wird beherrscht vom Pilz.

Am normalen Standort pflanzt sich der Flechtenpilz durch Sporen fort, die in den Apothezien gebildet werden (Abb. 81). Ein Apothecium der Wandschüsselflechte wird quer geschnitten und bei schwacher Vergrößerung beobachtet. Die Algenzone zieht vom Stiel aus in das Apothecium hinein und umschließt dieses bis zum Rande der Scheibe. Auch die Markhyphen dringen durch den Stil nach oben ins Gehäuse ein, verteilen sich hier und bilden eine schmale Zone besonders eng verflochtener Hyphen, das Subhymenium, aus. Dieser Subhymenialzone folgt das Hymenium, das sich durch seine bräunliche Farbe deutlich von den übrigen Schichten abhebt. Das ganze Hymenialgewebe färbt sich bei einem geringen Zusatz von Jodjodkalium dunkelblau und läßt sich so scharf von den übrigen Schichten trennen. In der Hymenialzone bemerkt man senkrecht gestellte feine Fäden (die Paraphysen) und zwischen diesen keulenförmige Verdickungen, die Sporenschläuche oder Asci. Da die Sporen zu verschiedenen Zeiten reif werden, kann man an einem Mikrotomschnitt immer reife Sporen von dunkelbrauner Farbe und unreife in den Asci beobachten. Die ausgeschleuderten Sporen treffen auf dem Substrat meistens ihnen zusagende Algen an und gehen mit diesen eine neue Verbindung ein, bilden einen neuen Thallus.

Eine andere Vermehrungsweise zeigt die graugrüne Laubflechte *Evernia prunastri*. An älteren Bäumen bildet diese 5—7 cm große, mit einer kleinen Haftscheibe an der Rinde befestigte bänderige Flechte große Bestände. Auf der Thallus-

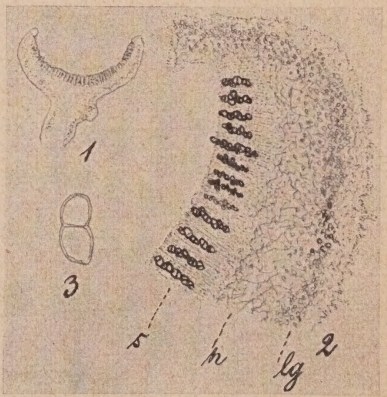


Abb. 82. Querschnitt durch ein Apothecium von *Anapthychia ciliaris*. — 1 = bei Lupenvergr. 2 = stärker vergr. 3 = Spore stark vergr. (*s* = Schlauchschicht, *h* = Hypothecium, *lg* = Lagerrand). Nach Migula

oberfläche und besonders an den Rändern finden sich kleine graugrüne Pünktchen, die ein feines Pulver abgeben. In Wassereinschluß wird etwas von diesem Pulver untersucht und man beobachtet einzelne oder mehrere kugelige Algen, die von Pilzhyphen fest umsponnen sind. Der Thallus entläßt also diese vegetativ gebildeten Ausbreitungseinheiten (Soredien) zusammen aus dem Thallus und beim Niederfallen auf einem günstigen Substrat sind Pilz und Alge gleich vereinigt und können einen neuen Thallus bilden. Die Brutstätten dieser Soredien werden Sorale genannt und im Schnitt zeigen sich große Mengen von im Heraustransport begriffenen Soredien.

Die Entwicklungsgeschichte der Frucht, des Apotheciums, ist sehr schwer zu studieren und zu beobachten, doch sei kurz darauf hingewiesen. Bei der Laubflechte *Anapthychia ciliaris* (Abb. 82), die häufig an Rinden vorkommt, sind kleine schwarze Punkte auf dem Thallus zu beobachten und

Abb. 83. *Marchantia*, männl. Pflanze. — Thallus mit Brutbecher und Antheridienständen (*a—d*) in verschiedenem Alter. *v* = Vegetationspunkte. (Aus Hdw. d. Naturw., Bd. VI.)

es muß versucht werden, einen solchen Punkt im Querschnitt zu treffen. *Anapthychia ciliaris* sieht fast schwarz aus, hat einen sehr festen Thallus und den Rändern entspringen viele zilientragende Fortsätze. Im Querschnitt beobachtet man bei den kleinen Pünktchen eine krugförmige Einsenkung des Thallus, die von den Algen umrahmt wird und im Innern mit einem dichten Hyphengeflecht erfüllt ist. Dies sind die Spermogonien der Flechten, und im Innern werden von den Hyphen stäbchenförmige Spermatien abgeschnürt, die aus einem an der Spitze gelegenen Porus austreten können. Die Spermogonien sind die männlichen Geschlechtsorgane der Flechten und man hat beobachtet, daß zur Anlage der Frucht eine Kopulation dieser Gebilde mit der Trichogyne, dem weiblichen Organ erfolgt. Die Trichogyne wird im Thallus angelegt, und zwar findet sich eine knäuelige Aufwickelung einer stark angeschwollenen Hyphe (Askogon), die nach oben zu gerade verläuft und mit der letzten Zelle aus der Oberfläche des Thallus herausragt. Erst nach der Verschmelzung von Trichogyne und Spermatium soll das Askogon zu den askogenen Hyphen auswachsen, doch sind diese Verhältnisse sehr umstritten. Während Spermogonien leicht beobachtet werden können, sind Askogon und Trichogyne nur sehr selten im Präparat zu entdecken. Vorbedingung sind natürlich feine Mikrotomschnitte.

27. Bau und Fortpflanzung der Moose

a) Lebermoose. Die Lebermoose sind gegenüber den Laubmoosen recht einfach gebaut und wir wählen zur Untersuchung eine Art aus, die noch nicht in Stamm und Blätter gegliedert ist: *Marchantia polymorpha* (Abb. 83 u. 84). Der Sproß dieses Mooses liegt mit der Unterseite dem Boden fest auf und besitzt einen Filz von Rhizoiden. Die Oberseite ist rhombisch gefeldert und auf der Mittelrippe kann man an größeren Exemplaren fast regelmäßig kleine Becherchen, die Brutbecher, beobachten. Die Fortpflanzungsorgane finden sich nicht direkt auf dem Thallus des Mooses; sie werden durch einen besonders ausgebildeten Träger über den Thallus emporgehoben. Kleine Gebilde, die wie Schirme aussehen, beherbergen die männlichen und weiblichen Fortpflanzungsorgane, die aber immer getrennt auf verschiedenen Pflanzen auftreten. Die weiblichen Organe (Archegonien) liegen auf der Unterseite von kleinen Schirmen, deren Rand deutlich 9strahlig ist; die Schirme mit den männlichen Organen (Antheridien) sind kleiner, nur gelappt und die Antheridien sind auf der Oberseite eingesenkt. — *Marchantia polymorpha* ist bei uns sehr verbreitet, und auf feuchten Wiesen, auf wenig be-

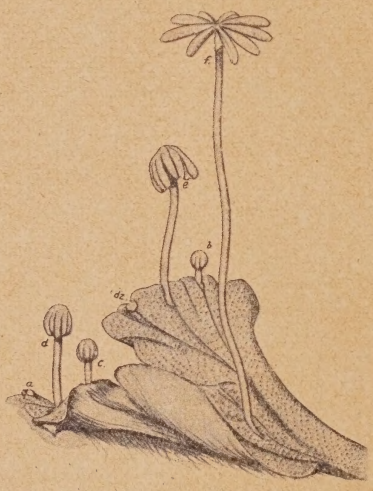


Abb. 84. *Marchantia*, weibl. Pflanze. — Thallus mit verschieden alten (*a—f*) Receptakeln. (Aus Hdw. d. Naturw. Bd. VI.)

gangenen schattigen Waldwegen und besonders an feuchten Grabenrändern ist dieses ziemlich stattliche Lebermoos immer zu finden. An den Brutbecherchen ist es leicht zu erkennen und das Aufsuchen der Geschlechtsstände macht keine Schwierigkeiten. Zu beachten ist jedoch, daß nicht an allen Orten beide Geschlechter vorkommen. — Zur Untersuchung genügen feine Rasiermesserschnitte (Holundermark) in Wassereinschluß.

Die auf der Mittelrippe des Thallus stehenden Brutbecherchen enthalten kleine, mit bloßem Auge noch gerade sichtbare Brutkörper, die mit einer feinen Lanzette vorsichtig herausgenommen werden. Sie zeigen bei schwacher Vergrößerung eine scheibenförmige Gestalt und seitliche Einschnürungsstellen. Die Zellen sind sehr reich an Chlorophyll, doch finden sich auch einige größere chlorophyllfreie Zellen, die nach der Aussaat zu Rhizoiden auswachsen werden. Am Rande liegen ölführende Zellen. Beide Seiten des Brutkörperchens sind gleich gestaltet, die Vegetationspunkte befinden sich bei den Einschnürungsstellen und je nach der Lage bei der Aussaat werden sich die Rhizoiden immer an der dem Boden zugewandten Seite entwickeln; die Zellen der anderen Seite bilden sich zu normalen Oberflächenzellen um. Ein senkrechter Schnitt parallel zur Längsachse des Sprosses zeigt uns die mit einer Stielzelle befestigten Brutkörperchen, die durch einen besonderen Schleim aus dem Becher herausbefördert werden. Die Brutkörper sind die vegetativ gebildeten Vermehrungsorgane von *Marchantia polymorpha*.

An feinen Querschnitten durch den scheibenförmigen Schirm können wir dann die männlichen Geschlechtsorgane, die Antheridien, beobachten, die in der Oberseite des Schirmes eingesenkt sind und einzeln in jeder Höhlung stehen. Die Wand dieser kleinen, ellipsoidischen Körper ist einschichtig und der ganze Inhalt wird durch senkrecht aufeinander stehende Zellwände in sehr kleine und zahlreiche kubische Zellen zerlegt. Beim Reifen des Antheridiums runden sich die Zellen ab und kommt nun ein Wassertropfen auf die Oberfläche des Schirmes, dann zerreißt die Antheridienwand, die Zellen treten heraus und färben das Wasser milchig trüb. Dieses Austreten kann man hervorrufen, indem man auf die Oberfläche eines trockenen Schirmes einen Wassertropfen absetzt. Unter dem Mikroskop zeigen sich bei starker Vergrößerung eine große Zahl dieser Mutterzellen, deren Membran bald verquillt und die Spermatozoiden ins Wasser entläßt. — Zur guten Sichtbarmachung müssen die Spermatozoiden fixiert und gefärbt werden. Ein wenig von der milchigen Flüssigkeit wird auf ein Deckglas gebracht und der hängende Tropfen auf den Hals einer Flasche mit Osmiumsäure gelegt. Die Fixierung ist nach kurzer Zeit vollzogen und zur Färbung füge man einen Tropfen Fuchsin-Methylgrün dem Präparat zu. Die beiden Zilien des Spermatozoids, der vordere und hintere Teil des Körpers nehmen rote Farbe an, während der größere Teil sich blau färbt und dadurch als aus Kernsubstanz bestehend gekennzeichnet wird.

Die weiblichen Organe, die Archegonien (s. Abb. 84), stehen in

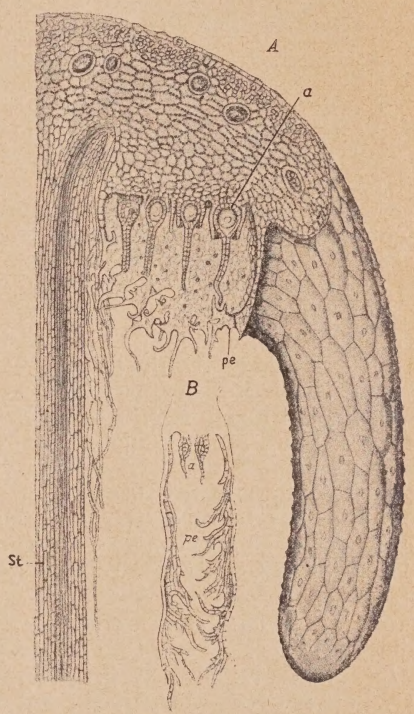


Abb. 85. *A* = Längsschnitt durch ein Stück eines Archegonienstandes von *Marchantia*. — *a* = Archegonien. *pe* = Perichaetium. *St* = Stiel. *B* = Perichaetium *pe* mit Archegonien *a*, stärker vergr. (Aus Sigmund)

Reihen angeordnet an der Unterseite des größeren 9strahligen Schirmes. Diese Unterseite des Schirmes ist aber morphologisch die Oberseite, denn durch Verschiebung der Wachstumszone biegt sich die Oberseite nach unten um und entwickelt hier die Archegonien. Mit dem Rasiermesser werden dünne Längsschnitte ausgeführt und in Wasser untersucht. Die Archegonien zeigen sich als flaschenförmige Gebilde, die einen sehr langen schlanken Halsteil und einen kürzeren stärkeren Bauchteil besitzen (Abb. 85). Der Halsteil wird aus den Kanalzellen gebil-

det, durch die der Halskanal bis zur Eizelle hinuntergeht, die im oberen Teil von der Bauchkanalzelle umschlossen wird. Bei dem Zutritt von Wasser beginnt bei jungen Archegonien zuerst der Inhalt des Halskanals zu verquellen und die Halszellen werden im oberen Teil sehr weit auseinander gepreßt.

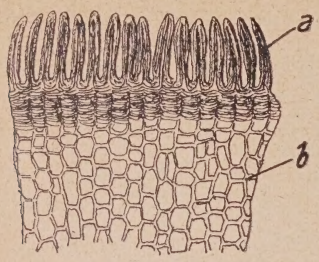


Abb. 86. Sporangienwand mit Peristom eines Laubmooses. — *a* = Peristom. *b* = Zellen der Sporangienwand. (Nach Sigmund)

Auch der Inhalt der Bauchkanalzelle verquillt und gleichzeitig rundet sich das am Grunde ganz gut sichtbare Ei ab. Diesen Vorgang kann man unter dem Mikroskop beobachten, wenn man die Schnitte trocken unter dem Deckglas durchsieht und ein junges Archegonium zur Beobachtung auswählt. Ein am Rande zugesetzter Wassertropfen beginnt jetzt langsam das Objekt zu durchfeuchten und der Öffnungsvorgang tritt sofort ein. Nach Strasburger-Koernicke soll sogar das Eindringen der Spermatozoiden zu verfolgen sein, die man dem Objekt zugefügt hat; beim Eindringen in den Halskanal werden die Spermatozoiden unsichtbar. — Bei den befruchteten Archegonien ist der Halsteil gebräunt und geschrumpft, und das Ei ist bereits in die Teilungsstadien eingetreten.

Aus der befruchteten Eizelle entwickelt sich die Mooskapsel oder das Sporogon. Bei *Marchantia* ist die Kapsel ein ganz kleiner, kurzgestielter Körper, der mit mehreren Zähnen an der Spitze aufplatzt und die Sporen frei läßt. Zwischen den Sporen liegen kleine, hohle Fäden (Elateren), die hygroskopische Bewegungen ausführen und der Sporenausschleuderung sehr günstig sind.

B. Laubmoose. Die beiden zur Untersuchung benötigten Laubmoose aus den Familien der Mniaceen und Polytrichaceen bilden in Wäldern, auf Waldwegen, Blößen und selbst im Grasrasen größere Bestände und sind leicht aufzufinden. Besonders *Polytrichum juniperinum* ist im Frühjahr sofort an den rotgefärbten Antheridienständen zu erkennen, die sich bei dem sehr robusten Moos (10—15 cm Höhe) umschlossen von den Hüllblättern an den Spitzen der Stämmchen finden. Bei *Mnium* schließen die oberen Blätter knospenförmig zusammen, sind dunkelgrün gefärbt und durch genau geführte Längsschnitte kann man die am Sproßscheitel stehenden Archegonien freilegen.

Die in Wassereinschluß beobachteten Schnitte zeigen bei Antheridien und Archegonien fast dieselben Verhältnisse wie wir sie schon bei den Lebermoosen kennen gelernt haben. Auf einfache Weise sind die Spermatozoiden von *Polytrichum* zu gewinnen. Einen angefeuchteten roten Antheridienstand nimmt man zwischen Daumen und Zeigefinger und übt nun einen gelinden Seitendruck aus. Auf der roten Scheibe wird sich sofort ein milchig getrübter Saft zeigen und dieser wird auf einem Deckgläschen abgetupft. In der Flüssigkeit schwimmen die Spermatozoiden in großer Zahl umher und die Präparation kann genau so wie bei den Lebermoosen erfolgen.

Sehr genau muß nun noch das Sporogon der Laubmoose untersucht werden, das eine bedeutend höhere Organisation als das der Lebermoose zeigt. Aus dem Sproß einer *Mnium*-Art sieht man einen schlanken Stiel (Seta) an der ehemaligen Stelle des Antheridiums hervorragen, der an seinem oberen Ende die Mooskapsel trägt. Meistens ist sie nicht mehr von der Haube (Kalyptra) bedeckt, doch kann man diese auch bei *Polytrichum* beobachten, weil die Verhältnisse bei beiden Moosen im Prinzip die gleichen sind. Mit dem Rasiermesser führt man erst zarte Längs- und später Querschnitte durch die Kapsel aus. Die

Abb. 87. Sporangiensorus von *Blechnum boreale*, quer. — *a* = Blattgewebe. *b* = Indusium. *c* = Sporangien. *d* = Sporen. *e* = verdickte Zellschicht des Öffnungsmechanismus

Kapselwand ist mehrschichtig gebaut und am Grunde treten bei manchen Arten Spaltöffnungen auf. Der Stiel setzt sich als Säulchen durch die Kapsel hindurch fort, wird Columella genannt und zwischen Columella und Kapselwand liegt der Sporensack. Die Kapsel wird verschlossen von einem Deckel, der durch das Verquellen besonders gestalteter Zellen, der Ringzellen, bei der Sporenreife zum Abfallen gebracht wird. Der Verschluß des Sporensackes ist aber nicht einfach, sondern doppelt. Unter dem Deckel liegt noch ein besonderer Verschluß, der durch kleine Zähne, Peristomzähne, gebildet wird, die vom Kapselrand zur Mitte reichen.

Zur Beobachtung der Peristomzähne (Abb. 86) entfernen wir mit einer Nadel den Deckel der Kapsel, schneiden den oberen Teil kurz unter dem Peristom ab und betrachten den trockenen Schnitt bei auffallendem Licht. Ist der Schnitt noch etwas feucht, so werden sich die Peristomzähne fest aneinander gelagert finden; bei trokkenen Schnitten neigen sie auseinander, stehen aufrecht und der Nachweis, daß sie hygroskopisch sind, ist durch Anhauchen und Beobachtung der eintretenden Bewegung leicht zu erbringen. Die Peristomzähne werden sich also nur bei trockenem Wetter öffnen und dann den Sporen den Weg nach außen freigeben. — Um die Zähnchen genauer sehen zu können, zerreißen wir den Schnitt mit einer Nadel, übertragen ihn in Wasser und bedecken mit einem Deckglas. Die Peristomzähne sind keine Zellen, sondern nur Verdickungsschichten von Zellreihen, die bei der Reife der Kapsel vertrocknet sind. Untersucht man die Peristome verschiedener Moose, so wird man bald entdecken, daß diese Gebilde nicht sehr einheitlich gebaut sind; häufig treten doppelte Reihen von Peristomzähnen auf, die Verdickungsleisten sind verschieden und all diese Unterschiede zusammen mit der Zahl der Zähne ergeben sehr wichtige Merkmale für die systematische Unterscheidung bestimmter Gruppen und Arten.[1])

Um den Entwicklungszyklus des Mooses zu schließen, versuchen wir jetzt noch den Vorkeim zu beobachten. In der Nähe der Moosrasen kann man bald nach der Sporenreife kleine grüne fadenförmige Gebilde sehen, die eine gewisse Ähnlichkeit mit Algen haben. Im Wassereinschluß zeigt sich ein solcher Faden als Moosvorkeim (Protonema) und beim Durchmustern mehrerer Präparate wird man eine kleine Entwicklungsreihe von der Knospe am Vorkeim bis zum Moospflänzchen beobachten können.

[1]) Vgl. Migula, Die Laubmoose. Buchbeilage zum „Mikrokosmos" 1928

28. Bau und Fortpflanzung der Farne

Die Farne (*Filicinae*) werden nach dem Bau ihrer Sporangien in zwei Unterklassen aufgeteilt. Die eusporangiaten Formen haben mehrschichtige Sporangienwände, während die Sporangienwände bei den leptosporangiaten nur einschichtig gebaut sind. Wir wählen zur Untersuchung einige allgemein verbreitete Vertreter der zweiten Gruppe aus: den bekannten Wurmfarn (*Aspidium filix mas*) und den Rippenfarn (*Blechnum spicant*). Beide Arten vermitteln uns neben der Kenntnis des verschiedenen Baues

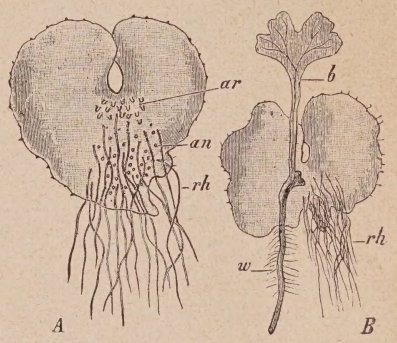


Abb. 88. Vorkeim (Prothallium) von *Aspidium filix mas*. — *A* = von unten gesehen. *ar* = Archegonien. *an* = Antheridien. *rh* = Rhizoiden. *B* = mit jungem Farn, der mit seinem Fuß am Prothallium ansitzt. *b* = äußerstes Blatt. *w* = die erste Wurzel. Etwa 6½f. vergr. (Aus Sigmund)

der Sporenbehälter auch gleichzeitig einen Einblick in den Bau des Farnblattes, das als Wedel bezeichnet wird. Die Wedel entspringen aus einem unterirdischen, mit braunen Spreuschuppen besetzten Rhizom und können nun ganz bestimmte Arten der Fiederung aufweisen. Bei *Aspidium* ist der Wedel doppelt bis dreifach gefiedert und unter den Fiederblättchen liegen die Sporenbehälter als kleine bräunliche Häufchen (Sori). Anders bei *Blechnum*: die Wedel sind nur einfach tief fiederspaltig und die Sori liegen immer auf bestimmten Wedeln, die eine viel schmälere Fiederspreite als die sterilen Wedel besitzen und infolgedessen leicht erkannt werden können. Die Sporangienhäufchen liegen nicht einzeln, sondern zeigen sich als zwei schmale lange „Rippen", die zu jeder Seite der Mittelrippe die gesamte Unterseite des Fiederabschnittes einnehmen. — Für Orientierungspräparate genügen auch hier Handschnitte zwischen Holundermark, die evtl. durch Kalilauge aufgehellt werden müssen.

An feinen Querschnitten durch den nicht zu alten sporangientragenden Fiederabschnitt des Rippenfarns beobachten wir den

Aufbau des Sorus (Abb. 87). Das Blattgewebe besteht aus einer Epidermis an Ober- und Unterseite und zwischen diesen beiden

Abb. 89. Querschnitt durch eine Blütenknospe von *Papaver rhoeas*. — *a* = Kelchblatt. *b* = Kronenblatt. *c* = Staubbeutel. *d* = Staubfaden. *e* = Narben. *f* = Fruchtknotenscheidewand. (Nach Sigmund)

Schichten befindet sich das Schwammparenchym. Die Sporangien entspringen in Mehrzahl an der Unterseite und sie werden bedeckt von einem feinen Häutchen (Schleier oder Indusium), das als Fortsetzung der Epidermis aufzufassen ist. Zwischen den beiden Sporangienhäufchen wölbt sich die Blattunterseite etwas vor und an der Ursprungsstelle des Indusiums sehen wir im Querschnitt je ein kleines Leitbündel. Betrachten wir ein einzelnes Sporangium genauer (Abb. 87 d). Die Kapselwand ist einschichtig und besteht aus ziemlich großen, verschieden gestalteten Zellen. Die eine Seite des Sporangiums wird helmartig überwölbt von einem Ring (Annulus) stark verdickter U-förmiger Zellen, die vom Sporangienstiel ausgehen und über den Kapselscheitel hinüberreichen; die eine Seite bleibt frei vom Ring. An dieser freien Stelle wird die Kapsel bei der Sporenreife aufreißen und durch stark wasserentziehende Mittel kann die Bewegung des Öffnens unter dem Mikroskop beobachtet werden. Wir setzen dem Präparat vom Rande des Deckglases her Glyzerin zu und sehen, daß die nicht verdickten Außenwände des Ringes sich infolge des Wasserentzuges stark in die U-förmigen Schenkel hineinbiegen. Der Ring wird konvex und die Kapsel reißt an der nicht vom Ring bedeckten Seite auf.

Gleiche Querschnitte werden durch den Sorus von *Aspidium filix mas* hergestellt. Auch hier wieder dasselbe Blattgewebe wie beim Rippenfarn, aber eine andere Anordnung der Sporangien und des Indusiums. Die Blattunterseite springt weit vor und von der Erhöhung aus bedeckt das Indusium nach beiden Seiten umschlagend die Sporangien. Besonders gut wird man hier die Entstehung der Sporangien aus einer Epidermiszelle beobachten können.

Zur Untersuchung der Archegonien und Antheridien muß ein Vorkeim von *Aspidium* aufgesucht oder durch Kultur gewonnen werden (Sporen in Blumentöpfen mit Walderde aussäen). Der Vorkeim — das Prothallium — des Wurmfarnes ist sehr klein, hat herzförmige Gestalt und erinnert in seinem Aussehen sehr an ein Lebermoos (Abb. 88). Die Geschlechtsorgane sind getrennt und an bestimmten Stellen der Unterseite des Vorkeimes lokalisiert. Mehr nach der Spitze zu in der Umgebung der Rhizoiden wird man mit einer scharfen Lupe kleine Pünktchen erkennen können, die Antheridien; die Archegonien sitzen in der Nähe der herzförmigen Einbuchtung. Zur Untersuchung machen wir feine Querschnitte durch die Antheridienzone des Prothalliums und versuchen, ein Antheridium in der Seitenansicht zu bekommen. Es ist ein kleines, kugeliges Gebilde, das aus zwei Ringzellen und einer Deckelzelle besteht. Ist das Antheridium reif, dann üben die Ringzellen durch das Verquellen einen Druck auf den Inhalt aus, die Deckelzelle wird abgesprengt und der Inhalt tritt in Form von kugeligen Zellen heraus. Auch die Wände dieser Zellen lösen sich in Wasser auf und das Spermatozoid mit seinem spiralig gewundenen Körper und dem Kranz von Zilien ist jetzt frei. Die Bewegung im Wasser ist außerordentlich lebhaft und erst nach Zusatz von ein wenig

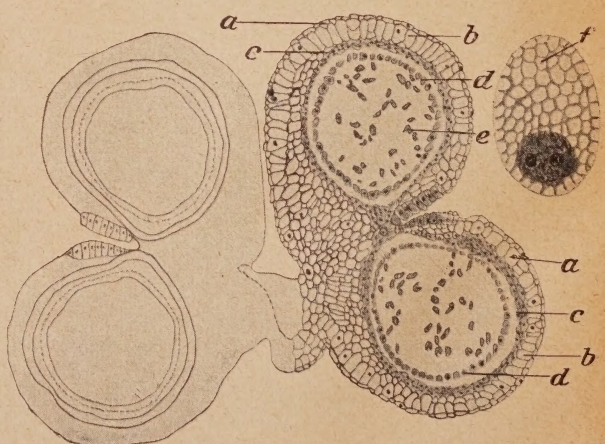


Abb. 90. Querschnitt durch eine reife Anthere von *Lilium martagon*. — *a* = Epidermis. *b* = Faserschicht. *c* = vergängliche Schicht. *d* = aufgelöste Tapetenschicht. *e* = fertige Pollen. *f* = Pollenkorn, stärker vergr.

10 %iger klar filtrierter Lösung von Gummi arabicum (nach Strasburger-Koernicke) kann man die Bewegung so verlangsamen, daß eine ruhige Beobachtung ermöglicht wird. — Zur Herstellung eines Dauerpräparates von Spermatozoiden verfährt man folgendermaßen (nach Strasburger-Koernicke, S. 559): Die in dem Wassertropfen auf dem Deckglas ausgetretenen Spermatozoiden werden wie bei *Marchantia polymorpha* (vgl. S. 65) fixiert und gefärbt. Der Tropfen wird dann ganz flach ausgebreitet und mit fein pulverisiertem Gummi arabicum bestreut. Nachdem die Lösung an der Luft eingetrocknet ist, fügt man einen Tropfen Kanadabalsam hinzu und macht das Präparat fertig; die Präparate sollen jahrelang haltbar sein.

Abb. 91. Keimende Pollenkörner (1—5) von *Allium ursinum*. — *a* = vegetativer (Pollenschlauch-)Kern. *b* = generative Zelle.

Mit gleicher Schneidetechnik erhalten wir auch die Archegonien. Der Bauchteil ist in das Prothalliumgewebe eingesenkt und nur der Halsteil ragt frei heraus. Der Halskanal ist umgeben von 4 Reihen von Halskanalzellen; er leitet hinunter zur Bauchkanal- und Eizelle. Auch hier erfolgt das Öffnen des Halskanals zum Eintreten der Spermatozoiden wieder bei Wasseraufnahme und unter starker Verquellung des Halskanalinhaltes. Die Spermatozoiden werden durch die vom Archegonium ausgeschiedene Apfelsäure chemotaktisch angezogen.

29. Fortpflanzungsorgane der Blütenpflanzen

Wenn wir uns hier mit den Fortpflanzungsorganen der Blütenpflanzen beschäftigen wollen, so können die folgenden Ausführungen dem Gesamtstoff in keiner Weise gerecht werden. Nur einige ausgewählte, ganz einfache Beispiele sollen die Verhältnisse des Blütenbaues klarlegen. Die Blütenpflanzen zerfallen ihrem Aufbau nach in zwei große Klassen: a Gymnospermen oder nacktsamige Pflanzen und b Angiospermen oder bedecktsamige Pflanzen. Bei den Angiospermen entwickelt sich die Samenanlage in einem geschlossenen Hohlraum, dem Fruchtknoten, der durch das Zusammentreten der Fruchtblätter gebildet wird. Die Samenanlagen der Gymnospermen liegen frei an der Oberseite oder an den Rändern der Fruchtblätter.

An einer Blüte unterscheiden wir, wenn diese in Kelch- und Blütenkrone deutlich gegliedert ist, folgende Teile: Die äußeren Hüllblätter, der Kelch, sind meistens von grüner Farbe und sie unterscheiden sich dadurch von den inneren Hüllblättern mit lebhafter Farbe (= Kronblätter, Blütenkrone) ganz deutlich. Innerhalb dieser Hüllblätter entwickeln sich die Fortpflanzungsorgane. Dem am Grunde der Blüte befindlichen Fruchtknoten sitzen der Griffel und die Narbe auf und diese Teile werden umgeben von einigen oder vielen Staubblättern. Die Anordnung und Zahl dieser einzelnen Blütenteile ist bei den verschiedenen Familien des Pflanzenreiches recht differenziert und das Blütendiagramm gibt uns ein Mittel zur systematischen Unterscheidung an die Hand. Wir wenden uns erst dem Blütendiagramm zu und versuchen uns mit Hilfe einer Abbildung aus Sigmund, Anatomie und Entwicklungsgeschichte der Phanerogamen (Abb. 89) ein Bild davon zu entwerfen. Die Klatschrose (*Papaver rhoeas*) ist allgemein verbreitet. Der Querschnitt durch die geschlossene Blütenknospe ergibt ein Bild, wie es Abb. 89 zeigt. Die Querschnitte müssen sehr vorsichtig und genau senkrecht zur Längsachse geführt werden und es erfordert einige Übung, diese Schnitte mit dem Rasiermesser gut zu führen. Sollten die Schnitte nicht gelingen, dann bette man in Paraffin ein und schneide mit dem Mikrotom. Zur Anfertigung von Handschnitten müssen die Blütenknospen und die Schnittfläche des

Abb. 92. Querschnitt durch die Narbe von *Papaver rhoeas* (Schnitthöhe in der Nähe des Äquators). — *a* = Zapfen-(Fruchtknoten-)wand. b = Narbengewebe. *c* = Fruchtknotenscheidewand. *d* = freier Narbenrand. (Nach Sigmund)

Messers dauernd mit Alkohol befeuchtet werden. Die Schnitte werden trocken auf den Objektträger übertragen, mit einem Deckglas vorsichtig bedeckt und erst dann wird ein Tropfen Wasser vom Rande her

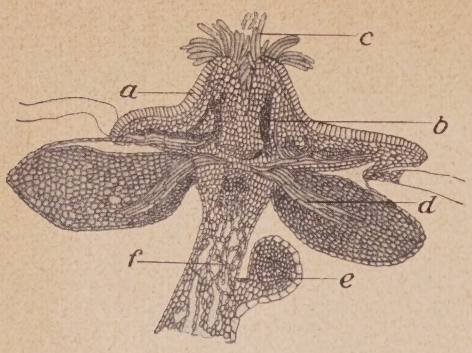


Abb. 93. Ein Stück aus Abb. 92 bei stärkerer Vergrößerung. — *a* = Epidermis der Narbe. *b* = Gefäße. *c* = Narbenpapillen. *d* = Milchsaftschläuche. *e* = Samenanlage. *f* = lockeres Parenchym der Fruchtknotenscheidewand. (Nach Sigmund)

zugesetzt. Auf einem guten Schnitt bilden die Kelchblätter den äußeren Ring und ihnen folgen die Kronblätter. Die Stellung dieser beiden Kreise ist so, daß die Kronblätter mit ihrer Mitte immer da liegen, wo die Kelchblätter mit ihren Rändern aneinanderstoßen. Während die Kelchblätter sich nicht überdecken, schieben sich die Kronblätter mit ihren Rändern immer übereinander. Im Querschnitt sehen wir die Staubgefäße (Staubbeutel) und den durchschnittenen Griffel. — Querschnitte durch die Staubbeutel der Türkenbund-Lilie (*Lilium martagon*) (Abb. 90), zeigen uns die Pollenfäden und in jüngeren Stadien auch die Tapetenzellen, die später bei der vollständigen Ausbildung des Pollens resorbiert werden.

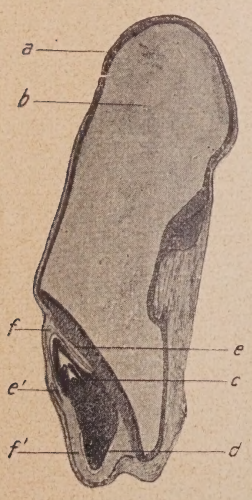


Abb. 94. Längsschnitt durch ein Weizenkorn (*Triticum vulgare*). — *a* = Frucht- u. Samenhaut. a^1 = Kleberschicht. *b* = Endosperm. *c* = Stammvegetationsspitze. *d* = Wurzelvegetationsspitze. *e* = Schildchen. e^1 = Epiblast. *f* = Kotyledonarscheide. f^1 = Wurzelscheide. (Nach Sigm.)

Zur Befruchtung der Blüte muß der Pollen auf die Narbe gelangen und hier auskeimen. Da dieser Vorgang am Objekt selbst nur schwer zu beobachten ist, veranlassen wir die Pollen zum Treiben der Keimschläuche (Abb. 91), indem wir sie in eine Rohrzuckerlösung übertragen. Für die verschiedenen Pollenarten schwankt der Konzentrationsgrad der Lösung in recht beträchtlichen Grenzen (z. B. Tulpe 1—3 % und Malve 30—40 %), doch genügt meistens eine 3—5 %ige Rohrzuckerlösung. Ein Tropfen dieser Lösung wird auf den Objektträger gebracht, und mit einem Pinsel übertragen wir die reifen Pollen von *Allium ursinum* (Bären-Lauch, s. Abb. 91) oder von Zimmergeranien. Der Objektträger kommt in eine feuchte Kammer und in bestimmten Zeitabständen, z. B. zwei Stunden, beobachten wir das Austreiben der Keimschläuche unter dem Mikroskop. Es liegt nicht im Rahmen dieser Darstellung, auf die Kernverhältnisse im Pollen während der Keimung einzugehen.

Die weiblichen Fortpflanzungsorgane der Angiospermen stehen in der Mitte der Blüte und sie werden meistens als Stempel be-

Abb. 95. Reife Pollenkörner (1—6) von *Pinus silvestris*. — *a* = Intine. *b* = Körperzelle. *c* = vegetativer Kern. *d* = geschrumpfte Prothalliumzellen. *e* = lufthaltige Blasen der Exine *f*. (Nach Sigmund)

zeichnet. Zu einem Stempel gehören aber mehrere Teile und sieht man sich eine Blüte genauer an, dann findet man im unteren Teil den eigentlichen Fruchtknoten, der sich nach oben zu stark verjüngt und den Griffel bildet. Als Abschluß des Griffels folgt die Narbe. Zur Beobachtung wählen wir eine Blüte des Winden-Knöterichs (*Polygonum convolvulus*) oder der Weißen Lilie (*Lilium candidum*), entfernen alle Blüten und Staubblätter und betten auf dem auf S. 18 beschriebenen Wege in Paraffin ein. An den mit Hämatoxylin gefärbten Längsschnitten erkennt man die verwachsenen Fruchtblätter (Karpelle), die sich nach oben zu verjüngen und in den Griffel mit der Narbe auswachsen. Das Innere der Fruchtknotenhöhle wird erfüllt von der Eizelle mit den Hüllen (Integumenten), die vom Grunde emporsteigend sich über den Scheitel hinüberwölben und hier eine kleine Öffnung (Mikropyle) freilassen. Der Pollenschlauch muß also von der Narbe aus durch das Griffelgewebe bis zur Mikropyle hindurchwachsen und erst dann können die Kernverschmelzungen erfolgen.

In einer bereits halb abgeblühten Blüte der Klatschrose finden wir die Nar-

benlappen, und da bereits vorher klar geworden ist, daß Griffel und Narbe nur eine Fortsetzung der Fruchtblätter darstellen, so dürfen wir hier einen Fruchtknoten vermuten, der aus der Verwachsung der Fruchtblätter hervorgegangen ist (Abb. 92). Rasiermesserquerschnitte zeigen uns einen mehrfächerigen Fruchtknoten und jedes Fruchtblatt trägt an seinen Seitenrändern Samenanlagen, die an einem kurzen Stiel befestigt sind (Abb. 93).

Aus der Befruchtung der Eizelle gehen der Keimling und das Nährgewebe hervor. Die mütterliche Pflanze sorgt vor für den jungen Keimling und deponiert in ihm eine gewisse Menge von Nahrungsstoffen (Eiweiß, Stärke und Fett) für die Zeit, da er noch nicht fähig ist, selbständig Nahrung aufzunehmen. Das Nährgewebe (Endosperm) kann als besonderer Gewebekörper auftreten, doch können die Reservestoffe sich auch in den Keimblättern (Kotyledonen) finden. An einem reifen Samen des Hirtentäschelkrautes (*Capsella bursa pastoris*) können wir die soeben angedeuteten Verhältnisse beobachten. Der Same wird mit Gummi arabicum auf einem kleinen Holzklötzchen aufgeklebt und mit dem Rasiermesser genau in der Medianebene geschnitten; die Schnitte müssen in Glyzerineinschluß untersucht werden. Der Keim erfüllt das ganze Samenkorn. Die eine Hälfte wird eingenommen von den beiden Keimblättern (Kotyledonen) und parallel zu ihnen liegt der Keimblattstamm, das Hypokotyl. Das Endosperm ist bei diesem Samen auf eine Zellschicht beschränkt, die dem Keimling fest anliegt und nach außen von der Samenschale, Testa, begrenzt wird. Die Jodreaktion färbt das Endosperm gelbbraun und deutet an, daß es sich bei dem Nährgewebe um Aleuronkörner handelt.

Ein Längsschnitt durch ein Weizenkorn (*Triticum vulgare*, Abb. 94) zeigt uns einen ganz anderen Bau und eine ganz andere Verteilung von Endosperm und Keimling. Der Keimling ist auf den unteren Teil des Kornes beschränkt, liegt schräg und berührt mit dem Schildchen das Endospermgewebe. Auf die einzelnen Teile des Keimlings kann nicht näher eingegangen werden, doch führen wir noch die Jodreaktion aus, um die Natur des Nährgewebes klarzustellen. Der größte Teil besteht aus Stärke und nur die der Samenschale angelagerte Schicht führt Aleuronkörner.

Bei den männlichen Blüten der nacktsamigen Pflanzen (Gymnospermen) stehen die Staubblätter (Sporophylle) in schraubiger Anordnung an besonderen Sprossen. Von einer reifen männlichen Blüte der Kiefer (*Pinus silvestris*) zupfen wir ein Staubblatt ab, treiben die Luft mit Alkohol aus und untersuchen in Wassereinschluß. An einem kurzen Stiel sehen wir zwei Pollensäcke, die ihren Inhalt zum Teil entleert haben oder durch einen leichten Druck auf das Deckglas dazu veranlaßt werden können. Der Pollen besteht aus einem helleren Mittelteil mit fein granuliertem plasmatischem Inhalt; seitlich setzen zwei dunkle Säckchen sich deutlich ab, die auf der Oberseite netzartige Konturen zeigen. Es sind dies die Flugapparate des Kiefernpollens (Abb. 95).

Literatur-Verzeichnis

1. Günther, Stehli u. Wagner: Mikroskopie für Jedermann (Stuttgart, Franckh'sche Verlagshandlung).
2. Günther, H.: Das Mikroskop und seine Nebenapparate (dgl.).
3. Stehli, G.: Das Mikrotom und die Mikrotomtechnik (dgl.).
4. Sigmund, Fr.: Anatomie und Entwicklungsgeschichte der Phanerogamen (dgl.).
5. Sigmund, Fr.: Anatomie und Entwicklungsgeschichte der Kryptogamen (dgl.).
6. Migula, W.: Die Grünalgen (dgl.).
7. Migula, W.: Die Flechten (dgl.).
8. Migula, W.: Die Laubmoose (dgl.).
9. Mikrokosmos, Zeitschr. f. angewandte Mikroskopie usw. (dgl.).
10. Brohmer-Stehli: Mikroskopie in der Schule (dgl.).
11. Kisser, J.: Leitfaden der Botanischen Mikrotechnik (Jena, Fischer).
12. Meierhofer, H.: Einführung in die Biologie der Blütenpflanzen (Stuttgart, K. G. Lutz).
13. Schneider-Zimmermann: Botanische Mikrotechnik. 2. Aufl. (Jena, Fischer).
14. Meyer, A.: Erstes mikroskopisches Praktikum. 3. Aufl. (Jena, Fischer).
15. Strasburger-Koernicke: Botanisches Praktikum. 7. Aufl. (Jena, Fischer.)

Inhalt

Seite

Einleitung 1

Erster Teil: Die Bearbeitung des Materials 2

A. Freihandtechnik 2

1. Kapitel: Allgemeines über die Anfertigung der Präparate . . 2

2. Kapitel: Beobachtungspräparate von kleinen Objekten 3

3. Kapitel: Herstellung von Freihandschnitten von großen Objekten 3

4. Kapitel: Zupfpräparate und Dünnschliffe 5

5. Das Mazerieren 6

6. Kapitel: Das Entkalken und Entkieseln. 7

7. Kapitel: Das Bleichen und Aufhellen 7

B. Mikrotomtechnik 8

8. Kapitel: Das Fixieren der Objekte 8

a) Die Vorbereitung des Materials 8

b) Einzelmittel 9

c) Fixiergemische 11

d) Fixiergemische für Chondriosomen 12

e) Tabelle 13

9. Kapitel: Das Auswaschen. . . 12

10. Kapitel: Das Entwässern und Härten 14

11. Kapitel: Das Konservieren . . 16

12. Kapitel: Das Schneiden von uneingebettetem Material mit dem Mikrotom 16

13. Kapitel: Das Einbetten der Objekte zur Anfertigung von Mikrotomschnitten 18

a) Die Paraffinmethode. . . . 18

1. Das Durchtränken mit Paraffin und das Einbetten in Paraffin 19

2. Paraffinschnittbänder . . 22

3. Schwierigkeiten beim Schneiden 25

Seite

4. Das Aufkleben der Schnitte 27

5. Befreiung der Schnitte vom Paraffin 29

6. Arbeitstabelle für die Paraffinmethode 29

b) Die Zelloidinmethode . . . 29

c) Die Glyzeringelatinemethode 31

14. Kapitel: Das Färben d. Schnitte 32

a) Karminate 33

b) Hämatoxylinfarben 34

c) Teerfarben 35

d) Mehrfachfärbungen 36

15. Kapitel: Das Einschließen der Präparate 37

a) Wässerige Einschlußmittel . 37

b) Harze und Balsame 38

Zweiter Teil: Einführung in die Pflanzenanatomie 40

16. Kapitel: Form und Inhalt der Zelle 40

17. Kapitel: Die Zellmembran . . 44

18. Kapitel: Das Zellgewebe. . . . 46

19. Kapitel: Oberhautgebilde . . . 48

20. Kapitel: Das Blatt. 50

21. Kapitel: Die Wurzel 51

22. Kapitel: Der Stamm 53

23. Kapitel: Der Vegetationspunkt des Stammes 57

24. Kapitel: Bau und Fortpflanzung der Algen 58

a) Konjugaten 58

b) Chlorophyceen 59

25. Kapitel: Bau und Fortpflanzung der Pilze 60

26. Kapitel: Bau und Fortpflanzung der Flechten 62

27. Kapitel: Bau und Fortpflanzung der Moose 64

a) Lebermoose 64

b) Laubmoose 66

28. Kapitel: Bau und Fortpflanzung der Farne 67

29. Kapitel: Die Fortpflanzung der Blütenpflanzen. 69

Literaturverzeichnis 71

Inhalt 72

Sachregister 73

Sachregister

Achillea 49
Adlerfarn 47
Agrostemma 48
Alaunhämatoxylin 34
Aleuronkörner 43
Angiospermen 69
Algen 58
Algenpilze 60
Alkohol zum Fixieren 9
Alkoholtabelle 15
Allium 41, 51
Amaryllis 70
Ananas 49
Anaptychia 64
Anilinblau 36
Anulus 68
Antheridien der Farne 68
,, ,, Laubmoose 66
,, ,, Lebermoose64
Apothezium 63
Aprikose 45
Archegonien der Farne 68
,, ,, Laubmoose 66
,, ,, Lebermoose64
Aristolochia 55, 56
Armleuchtergewächse 7, 46
Ascomyceten 61
Askogon 64
Asphaltlack 38
Aspidium 44, 67
Aufbewahrungsgemisch, Strasburger-Flemmingsches 16
Aufblocken der Objekte 23
Augenblickspräparate 2
Aufhellen 7
Aufhellungsmittel 7
Aufklebemethoden 27
Aufkleben der Schnitte 27

Bandführung am Mikrotom 25
Balsame 38
Basidien 62
Basidiomyceten 62
Bastteil 54
Bauchkanalzelle 66
Baumwolle 40
Befreiung der Schnitte von Paraffin 28
Benzol 46
Beta 47
Bertholletia 46
Beschaffung des Materials 1
Beobachtungspräparate 3
Bewegungsbeobachtung 3
Blatt 50
Blattanlage 58
Blattnerven 50
Blattschuppen 49
Blechnum 67
Bleichen 7
Blütendiagramm 69
Blütenpflanzen 69
Bohnenstärke 42
Bonner Mischung 11
Borke 57
Brennessel 49
Bryonia 47
Brutbecher 65

Carnoysches Gemisch 11
Capsella 71
Carpelle 70
Ceratophyllum 57
Champignon 62
Characeen 46
Cheiranthus 48
Chlor zum Aufhellen 7
Chloralhydrat 7. 46
Chlorophyceen 59, 63
Chlorophyllkörner 41
Chondriosomen 12
Chromatophoren 41
Chromsäure 10
Cirsium 44
Chladophora 59
Claviceps 59, 60
Collema 62
Corylus 46
Cotyledonen 71
Cucurbita 43, 48, 55
Cyanophyceen 63

Dauerpräparate 2
Dammarharz 39
Dattel 45, 46
Dermatogen 53
Desmidiaceen 40
Diatomeen 40
Dicotyledonen 52
Differenzieren 33
Doppeleinbettung 31
Drehtisch 38
Dreifachfärbung, Flemmingsche 36
Drüsenhaare 50
Durchtränkung mit Paraffin 19
Durchlaßzellen 55
Dünnschliff 5

Eau de Javelle 7
Edelweiß 49
Efeu 49
Einbettung der Objekte 18
,, in Paraffin 20
Einbettungsrähmchen oder -winkel 21
Einfachfärbung 33
Einschlußmittel 37
Einschließen der Präparate 37
Eisenhämatoxylin 43
Eisenkarmalaun 34
Eiweißglyzerin 27
Elateren 66
Elodea 40, 42, 57
Endodermis 52
Endosperm 71
Engelsüß 44
Entkalkung 7
Entkieselung 7
Entwässern 14
Eosin 36
Epidermis 50
Eriophorum 49
Essigsäure z. Fixieren 10
Essigsäure z. Mazerieren 5
Eugenol 46
Exodermis 52

Fairchildsche Siebeimerchen 14
Farne 67
Färben 32
Färbungen, histologische 33
,, progressive 33
,, regressive 33
,, zytologische 33
Faszikularkambium 56
Festigungsgewebe 46
Ficus 45
Fibrovasalbündel 54
Fixierung 8
Fixiergemische, Tabelle 13
Fixiermittel u. Gemische 9, 11
Flechten 62
Flemmingsches Gemisch 11
Flußsäure 7
Formol z. Fixieren 10
Formalin z. Konservierung 16
Freihandschnitte 3
Freihandtechnik 2
Froschbiß 3
Fruchtblätter 70
Fruchtknotenhülle 70
Fuchsia 41
Fuchsin 35
Funaria 41

Gallertflechte 63
Gefäßteil 54
Gelatine z. Aufkleben 28
Gentianaviolett 35
Georgine 43
Gewürznelke 45
Glyzeringelatine-Methode 31
,, ,, Arbeitstabelle 32
Glyzeringelatine z. Einschliessen 37
Gnaphalium 49
Goldlack 48
Gonidien 63
Gossypium 40
Gummibaum 45
Gymnospermen 69

Hadrom 54
Hahnenfußgewächse 52
Haare 48
Haare, vielzellige 49
Haselnuß 46
Hämalaun, saures 34
Hämatoxylin 34
Härten 14
Harze 38
Hippuris 57
Hirtentäschelkraut 71
Hölzer 16
Holzparenchym 56
Hornkraut 57
Hoyersches Gemisch 37
Hyazinthe 51

Hydrocharis 3
Hyphen 60
Hypokotyl 71

Initialzelle 53
Integument 70
Interfaszikularkambium 56
Inulin 43
Iris 41, 43, 52

Johannesbeere 46
Juelsche Gemische 11

Kammer, feuchte 2
Kaisers Sublimat-Eisessig 12
Kaliumbichromat 10
Kalilauge zum Aufhellen 7
,, ,, Mazerieren 6
Kalyptra 53
Kalyptrogen 53
Kanadabalsam 38
Kambium 54
Kampferwasser z. Konservieren 16
Karbolsäure 7
Karmalaun 33
Karminate 33
Kartoffelstärke 42
Kastanie 44
Keimblätter 71
Kiefer 71
Kiefernholz 56
Kirsche 46
Kieselalgen 40
Kieselsäure 46
Kittplatte 22
Klatschrose 69
Kohl-Kratzdistel 44
Kollenchym 74
Konidien 62
Königskerze 49
Konjugaten 58
Konservieren 16
Kopfschimmel 60
Kopulationskanal d. Algen 59
Korkkambium 56
Korkzellen 56
Kornrade 48
Kreuzkraut 44
Kribralprimanen 54
Kribralteil 54
Kribrovasalbündel 54
Kristalldrusen 44
Krönigscher Lack 38
Kürbis 44, 48, 55
Küvetten 28

Lärche 46
Laubflechten 63
Laubmoose 66
Lebermoose 64
Leitbündel, geschlossenes 54
,, offenes 55
,, radiales 52
Leitgewebe 46, 47
Leitergefäße 47
Lemna 43
Lentizellen 57
Leptom 54
Levkoje 49
Lilie 70
Lilium 70
Lichtgrün SF 36
Löwenzahn 48

Mais 53
Marchantia 64
Markhyphen 63
Markstrahlen 55
Maskenlack 38
Matthiola 49
Mauerpfeffer 41
Mazeration 6
Mazerationsgemisch nach Schulze 6
Meerzwiebel 43
Mehrfachfärbung 33, 36
Membranfärbung, unverholzte 37
,, verholzte 37
Mesophyll 51
Mestom 54
Methylgrün 35
Mikropyle 70
Mikrotomtechnik 8
Milchröhren 48
Mnium 66
Mohn 49
Monobromnaphtalin 46
Monocotyledonen 52
Moose 64
Morchel 62
Möhre 41
Mucor 60
Mutterkorn 60
Myriophyllum 57
Myzel 60

Nadelblatt der Kiefer 51
,, der Tanne 51
Nährgewebe 71
Netztracheen 47
Nitella 41

Oberhautgebilde 48
Ölweide 49
Orange G 36
Osmiumsäure 10
Oxalsäure z. Mazerieren 6

Palisadenzellen 50
Papaver 49, 69
Paraffinmethoden 18, 19
Paraffinmethode, Arbeitstabelle 29
Paraffinschnittbänder 22, 24
Paranuß 46
Paraphysen 62
Pelargonie 50
Penicillium 61
Periblem 53
Periderm 56
Peristom 67
Perizykel 52
Pfeifenstrauch 55, 56
Pfeiffersches Gemisch 12
Phenol 46
Phloem 54
Phragmites 47
Phycomyceten 60
Pianese 36
Pikrinsäure 10
Pilze 60
Pinus 71
Platinchlorid 10
Plerom 53
Polygonum 70
Polypodium 44
Polytrichum 66
Populus 50
Präparierlupe 5
Präparierplatte 5
Prothallium 68
Protonema 67
Protoplasmarotation u. -zirkulation 41
Protoplasmaströmung 41
Prunus 46
Psalliota 62
Pteridium 47

Randverschluß 38
Ranunculaceen 52
Raphiden 43
Rasiermesserschnitte 4
Reinigung der Deckgläser und Objektträger 2
Rhizoiden 64
Ringtracheen 47
Rippenfarn 67
Rose 4
Rübe 47

Safranin 35
Safranin-Lichtgrün 36
Saftfäden 62
Salix 40
Sauerklee 40
Säurefuchsin 36
Schachtelhalm 46
Schaffnitscher Entwässerungsapparat 14
Schafgarbe 49
Schilf 47
Schimmelpilze 61
Schlauchpilze 61
Schnittbänder 21
Schnittbänderkrümmung 26
Schnittfärbung 32
Schnittstrecker 25
Schöllkraut 48
Schraubenalge 40, 58
Schraubentracheen 47
Schwammparenchym 50
Schwarzwurzel 48
Schwärmsporen 60
Schwertlilie 41, 43, 52
Scilla 43
Sedum 41
Senecio 44
Siebröhren 47, 48
Siebteil 54
Sklerenchym 46, 55
Sklerotien 60
Soredien 64
Sorus 67, 68
Spaltöffnungen 50
Spermatien 64
Spermatozoiden d. Moose 65

Spermogonien 64
Sphärokristalle 43
Spirogyra 58
Sporangien 68
Sporogon der Laubmoose 66
,, ,, Lebermoose 66
Sporophylle 71
Stamm, Bau des 53
Ständerpilze 62
Stärke 42
Staubblätter 71
Staubgefäße 70
Steinflechten 5
Steinzellen 45
Stempel 70
Sterigmen 62
Stückfärbung 32
Sublimat 10
Symbiose 63

Tannenwedel 57
Tapetenzellen 70
Tausendblatt 57
Teerfarben 35
Tomate 41
Tracheen 47
Tracheiden 47
Tradescantia 40
Treppengefäße 47
Trichogyne 64
Triticum 71
Trockenpräparate 2
Tüpfelkanäle 45
Türkenbund 70

Urtica 49

Vallisneria 41
Vasalteil 54
Vegetationskegel 5
Vegetationspunkt d. Stammes 57
,, d. Wurzel 82
Venetianer Terpentin 38
Verbascum 49
vom Tathsches Gemisch 12
Vorkeim 67

Wachsfüßchen 3
Walnuß 45
Wasserlinse 43
Wasserpest 40, 42, 57
Wasserstoffsuperoxyd z. Aufhellen 7
Wasserstrahlluftpumpe 8
Weide 40
Weizenkorn 71
Weizenstärke 42
Wettermoos 42
Winden-Knöterich 70
Wollgras 49
Wurmfarn 44, 67
Wurzel, Bau der 51
Wurzelhaare 51
Wurzelhaube 53

Xanthoria 54
Xylem 62

Zaunrübe 47
Zea Mays 53
Zeitpräparate 2
Zellkern 41
Zellmembran 44
Zelloidin-Methode 29
,, Arbeitstabelle 31
Zenkersches Gemisch 12
Zentralstrang 52
Zieralgen 40
Zupfpräparate 5
Zwiebel 41, 51
Zygosporen 58, 61
Zygote 59
Zylindermikrotom 4
Zystolithen 45

Naturwissenschaftliche Werke in zeitgemäßer Form

Prof. Dr. P. Brohmer und Dr. G. Stehli

Mikroskopie in der Schule

Ein Hand- u. Hilfsbuch für den biologischen Unterricht aller Schularten. Mit 145 Abb., Geb. RM 6.50.

H. Stridde

Allgemeine Zoologie in Verbindung mit Mikroskopie und Sezierübungen

Mit 310 Abbildungen im Text. 2. verbesserte Auflage Geb. RM 7.50.

Studienrat R. Thiel

Biologiebuch für den Arbeitsunterricht der Untersekunda (Obersekunda d. Gymnasien.)

Mit 70 Textabbildungen und 16 Tafeln. Geb. RM 4.— Genehmigt durch das Preuß. Minist. für Wissenschaft, Kunst u. Volksbildung. Das erste Lehrbuch, in dem der ungeheure einzigartige Bilderschatz des berühmten Kahn'schen Werkes „Das Leben des Menschen" Verwertung findet.

FRANCKH'SCHE VERLAGSHANDLUNG, STUTTGART

Kosmos-Mikroskop

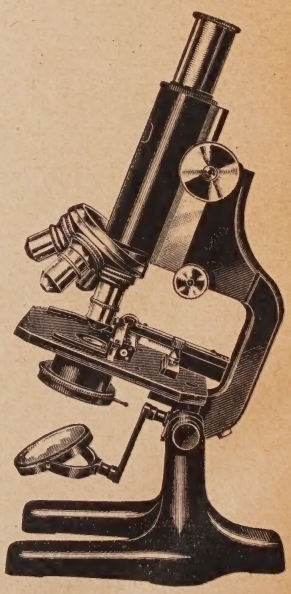
Modell C

Das Instrument für den Naturfreund und Forscher

Bewährtes Schulstativ — Umlegbar für Mikroprojektion

Ausbaufähig für alle Sonderarbeiten

Kleinere und grosse Stative erster Werkstätten



Laboratoriums-Bedarf

für Mikroskopie

Geräte, Glaswaren, Reagenzien, Färbemittel

Einrichtung vollständiger Laboratorien

Kosmos-Mikrotom

nach Minot

für Bänder- und Einzelschnitte

Ausführliche Listen kostenfrei

Geschäftsstelle des Mikrokosmos, Stuttgart

University of Toronto
Library

DO NOT
REMOVE
THE
CARD
FROM
THIS
POCKET

Acme Library Card Pocket
Under Pat. "Ref. Index File"
Made by LIBRARY BUREAU

Bot
S

240807

Author Stehli, Georg and Kolumbe, E.

Title Die botanische Mikrotechnik.

NAME OF BORROWER.